



## ارزیابی تنوع ژنتیکی برخی ژنوتیپ‌های نخود کابلی با استفاده از نشانگرهای ISSR

مهدیه لری نژاد<sup>۱</sup>، مهدی مهبجی\*<sup>۲</sup>، روح الله عبدالشاهی<sup>۳</sup>، علی کاظمی پور<sup>۴</sup>، داود صادق زاده اهری<sup>۵</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.

<sup>۲</sup> استادیار اصلاح نباتات، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.

<sup>۳</sup> دانشیار اصلاح نباتات، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.

<sup>۴</sup> استادیار بیوانفورماتیک، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.

<sup>۵</sup> استادیار مرکز تحقیقات دیم ایران، مراغه، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۸/۱۳، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۳/۱۱

### چکیده

نخود مهم‌ترین گیاه تیره حبوبات در ایران است و از آنجا که ایران بخشی از مرکز تنوع این گیاه به شمار می‌آید مطالعه تنوع ژنتیکی آن حایز اهمیت است. به منظور بررسی تنوع ژنتیکی نخود کابلی ۸۱ ژنوتیپ نخود کابلی از سه مبداء موسسه ایکاردا، ترکیه و ایران در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه شهید باهنر کرمان در سال زراعی ۹۳-۹۴ کشت شد. از نه آغازگر ISSR برای بررسی تنوع استفاده شد و ۷۹ نوار چندشکل از آغازگرهای مورد استفاده به دست آمد. تعداد آلل موثر از ۱/۱۹ (آغازگر  $(CAC)_5AG$ ) تا ۱/۶۹ (آغازگر  $(ACTG)_4$ ) متغیر بود. متوسط ضریب تنوع ژنتیکی نی و شاخص شانون در کل جمعیت به ترتیب ۰/۲۴ و ۰/۳۸ به دست آمد. ضریب تنوع نی برای جمعیت‌های مبداء ایکاردا، ترکیه و ایران به ترتیب ۰/۲۷، ۰/۲ و ۰/۲ و شاخص شانون برای این جمعیت‌ها به ترتیب ۰/۴۴، ۰/۳۲ و ۰/۳ به دست آمد. تجزیه واریانس مولکولی تفاوت میان جمعیت‌ها را معنی دار نشان داد. ولی واریانس بین جمعیت‌ها تنها ده درصد کل واریانس بین ژنوتیپ‌ها را به خود اختصاص داد. تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها را به چهار گروه تقسیم کرد. نتایج تجزیه خوشه‌ای نیز موید گستردگی تنوع درون جمعیت‌ها بود. تجزیه ساختار جمعیت با استفاده از نرم افزار STRUCTRE جمعیت را به چهار گروه با تعداد ۱۴، ۵، ۸ و ۴ ژنوتیپ برای هر گروه تقسیم کرد. تعداد ۵۱ ژنوتیپ باقی مانده نیز به عنوان ژنوتیپ‌های مخلوط در نظر گرفته شدند. این پژوهش نشان داد که تنوع ژنتیکی مطلوبی میان ژنوتیپ‌های نخود کابلی مورد مطالعه در این تحقیق وجود دارد که می‌تواند در برنامه‌های به‌نژادی مورد استفاده قرار گیرد.

**واژه‌های کلیدی:** نخود، تنوع ژنتیکی، تجزیه واریانس مولکولی، نشانگر ISSR.

حفاظت مواد ژنتیکی می‌باشد. به عبارت دیگر ارزیابی تنوع ژنتیکی برای مدیریت مؤثر و حفظ منابع ژرم پلاسما، ژن‌های ارزشمند و تجمع این ژن‌ها در ارقام جدید ضروری است. خاستگاه و مرکز تنوع نخود زراعی جنوب قفقاز، شمال ایران و جنوب شرقی ترکیه ذکر شده است. همچنین نخود دارای یک مرکز تنوع ثانویه در شبه قاره هند است (Van der Maesen *et al.*, 2007). از این رو مطالعه ژرم پلاسماهای نخود کابلی این مناطق حائز اهمیت دوچندان است.

تفاوت‌های بین ژنوتیپ‌ها از نظر ویژگی‌های زراعی، مورفولوژیک و بیوشیمیایی به طور مستقیم و غیرمستقیم نشان دهنده اختلافات در سطح DNA آنها است. بنابراین، کسب اطلاعات در مورد تنوع ژنتیکی می‌تواند بر اساس صفات زراعی، مورفولوژیک و بیوشیمیایی یا از طریق تفاوت‌های مولکول DNA صورت پذیرد (Tahir & Karim, 2011). نشانگرهای مبتنی بر DNA تحت تأثیر شرایط محیطی یا مراحل رشد گیاه قرار نمی‌گیرند و این ویژگی، آنها را در ارزیابی تنوع ژنتیکی برتری می‌بخشد (Collard *et al.*, 2005). از جمله نشانگرهای DNA که در بررسی تنوع ژنتیکی به

نخود گیاهی خودگشن از تیره حبوبات است. نخود نسبت به سایر حبوبات با شرایط اقلیمی ایران سازگاری بیشتری دارد و در کنار منابع پروتئین‌های حیوانی می‌تواند بخشی از پروتئین‌های مورد نیاز بدن را تامین کند (Wallace *et al.*, 2016). در مجموع ۸۰ درصد وزن خشک بذر نخود را کربوهیدرات و پروتئین تشکیل می‌دهد (Talebi *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2008). ارزش بیولوژیکی پروتئین نخود ۷۸ - ۵۲ درصد بیشتر از سایر حبوبات گزارش شده است (Samdaliri *et al.*, 2010).

سطح زیر کشت نخود در دنیا حدود ۱۳ میلیون هکتار و تولید سالانه جهانی آن ۱۲ میلیون تن است (FAO, 2014). ایران پس از کشورهای هند، پاکستان و ترکیه با حدود ۴۵۰۰۰۰ هکتار، چهارمین سطح زیر کشت نخود را دارد. میزان تولید محصول نخود در ایران ۱۹۳۰۰۰ تن در سال و عملکرد آن در واحد سطح ۴۱۰ کیلوگرم در هکتار است (SJKM, 2015).

تنوع ژنتیکی یکی از مهم‌ترین ارکان به‌نژادی به شمار می‌رود و مطالعه و برآورد تنوع ژنتیکی راه را برای پیشبرد برنامه‌های به‌نژادی در گیاهان هموار می‌نماید (Von Braun & Virchow, 1996). از سوی دیگر تخمین میزان تنوع ژنتیکی به عنوان یکی از مراحل مهم و اساسی در نگهداری و

دلایل عملکرد اندک نخود را به تنوع ژنتیکی کم آن نسبت می‌دهند (Clarke & Siddique, 2004). در یک مطالعه با استفاده از نشانگر RAPD روی برخی ارقام نخود زراعی و شش گونه یکساله وحشی جنس Cicer از ۴۲ آغازگر مورد استفاده تنها نه آغازگر در همه گونه‌ها چندشکل بود (Talebi et al., 2009). در مطالعه دیگری روی ۱۳ ژنوتیپ مختلف گونه زراعی *Cicer arietinum* L. و گونه اجدادی *Cicer reticulatum* L. نخود با استفاده از نشانگر ISSR گونه زراعی و گونه وحشی اجدادی به خوبی توسط نشانگر تفکیک شدند (Gautam et al., 2016). یک بررسی دیگر به وسیله نشانگر AFLP روی تنوع ژنتیکی برخی ژنوتیپ‌های نخود کابلی، تنوع ژنتیکی اندکی را بین ژنوتیپ‌ها نشان داد (Huttel et al., 1999). هدف مطالعه حاضر بررسی تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های نخود کابلی به وسیله نشانگرهای ISSR و مقایسه ژنوتیپ‌های وارد شده از کشور ترکیه، موسسه ایکاردا و برخی ژنوتیپ‌های بومی ایران به عنوان قسمتی مهمی از مرکز پیدایش و اهلی سازی نخود کابلی در آزمایش بود.

#### مواد و روش‌ها

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی نخود کابلی ۸۱ ژنوتیپ این گیاه در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه شهید باهنر کرمان در سال زراعی ۹۴-۹۳ کشت شد که شامل ۳۰ ژنوتیپ نخود کابلی از مبدا ایکاردا، ۴۵

طور گسترده به کار رفته است می‌توان به <sup>۱</sup>RFLPs، <sup>۲</sup>RAPDs، <sup>۳</sup>AFLPs، <sup>۴</sup>SSR و <sup>۵</sup>ISSR اشاره کرد. نشانگر ISSR یکی از نشانگرهای مولکولی کارآمد با امتیازدهی غالب است. این نشانگر از توالی‌های ریز ماهواره به عنوان تنها آغازگر در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز استفاده می‌کند. نشانگرهای ISSR از چند شکلی بالا برخوردار بوده و در مطالعات تنوع ژنتیکی، فیلوژنی، نقشه یابی ژنومی و زیست شناسی تکاملی نخود استفاده شده‌اند (Choudhary et al., 2013; Singh et al., 2014). از نشانگر ISSR در برآورد تنوع ژنتیکی بین و درون سایر گیاهان زراعی و باغی از جمله برنج (Joshi et al., 2000)، گندم (Du et al., 2002) چغندر قند (Keykhosravi et al., 2017) جو (Fernandez et al., 2002) و انگور (Keshavarz- Khoob et al., 2015) نیز استفاده شده است.

نشانگرهای مولکولی در گونه زراعی نخود به نسبت سایر گونه‌های زراعی کم تر استفاده شده است. برخی دلایل احتمالی آن را تنوع ژنتیکی کم در خزانه‌های کشت شده این گونه می‌دانند (Varshney et al., 2007) و از این رو یکی از

<sup>۱</sup> Restriction Fragment Length Polymorphism

<sup>۲</sup> Random Amplified Polymorphic DNA

<sup>۳</sup> Amplified Fragment Length Polymorphism

<sup>۴</sup> Simple Sequence Repeat

<sup>۵</sup> Inter Simple Sequence Repeat

ژنوتیپ از مبدا کشور ترکیه و شش رقم بومی ایران بود. (جدول ۱).

جدول ۱- ژنوتیپ‌های نخود کابلی مورد استفاده در این تحقیق.

**Table 1- Name Studied Kabuli chickpea genotypes used in the present study.**

شمار No.	ژنوتیپ Genotype	منشاء Origin	شمار No.	ژنوتیپ Genotype	منشاء Origin	شمار No.	ژنوتیپ Genotyp	منشاء Origin
1	FLIP03-50C	ICARD	29	FLIP07-	ICARD	57	TRK61	Turke
2	FLIP03-70C	ICARD	30	FLIP08-38C	ICARD	58	TRK63	Turke
3	FLIP03-98C	ICARD	31	Landrace1	Iran	59	TRK44	Turke
4	FLIP03-	ICARD	32	Landrace2	Iran	60	TRK144	Turke
5	FLIP03-	ICARD	33	Landrace3	Iran	61	TRK67	Turke
6	FLIP05-18C	ICARD	34	Landrace4	Iran	62	TRK51	Turke
7	FLIP05-19C	ICARD	35	Landrace5	Iran	63	TRK163	Turke
8	FLIP05-	ICARD	36	Landrace6	Iran	64	TRK64	Turke
9	FLIP05-	ICARD	37	TRK115	Turkey	65	TRK127	Turke
10	FLIP05-	ICARD	38	TRK69	Turkey	66	TRK96	Turke
11	FLIP05-	ICARD	39	TRK19	Turkey	67	TRK106	Turke
12	FLIP06-37C	ICARD	40	TRK3	Turkey	68	TRK56	Turke
13	FLIP06-52C	ICARD	41	TRK95	Turkey	69	TRK80	Turke
14	FLIP06-88C	ICARD	42	TRK101	Turkey	70	TRK169	Turke
15	FLIP06-	ICARD	43	TRK126	Turkey	71	TRK41	Turke
16	FLIP07-3C	ICARD	44	TRK18	Turkey	72	TRK48	Turke
17	FLIP07-4C	ICARD	45	TRK66	Turkey	73	TRK72	Turke
18	FLIP07-6C	ICARD	46	TRK93	Turkey	74	TRK39	Turke
19	FLIP07-8C	ICARD	47	TRK117	Turkey	75	TRK121	Turke
20	FLIP07-26C	ICARD	48	TRK129	Turkey	76	TRK65	Turke
21	FLIP07-33C	ICARD	49	TRK21	Turkey	77	TRK128	Turke
22	FLIP07-45C	ICARD	50	TRK70	Turkey	78	TRK38	Turke
23	FLIP07-46C	ICARD	51	TRK12	Turkey	79	TRK165	Turke
24	FLIP07-52C	ICARD	52	TRK104	Turkey	80	TRK110	Turke
25	FLIP07-65C	ICARD	53	TRK118	Turkey	81	TRK120	Turke
26	FLIP07-75C	ICARD	54	TRK103	Turkey			
27	FLIP07-81C	ICARD	55	TRK54	Turkey			
28	FLIP07-	ICARD	56	TRK161	Turkey			

روش CTAB تغییر یافته استخراج شد (Saghai-  
Maroof, et al., 1984). برای تعیین کیفیت و

DNA ژنومی از بافت برگ گیاهچه‌های رشد  
یافته در مزرعه در مرحله ۴-۵ برگگی با استفاده از

نوارهای به دست آمده از نشانگر دارای نوارهای استاندارد ۱۰۰bp استفاده شد. شاخص اطلاعات شانون، شاخص نی، و تعداد آللهای موثر و غیر موثر برای بررسی تنوع درون ژنوتیپها با استفاده از نرم افزار POPGENE 32 (Yeh *et al.*, 1999) محاسبه شد. تجزیه واریانس مولکولی<sup>۶</sup> (AMOVA) توسط نرم افزار GenALEX 6.5 (Peakal & Smouse, 2006) صورت گرفت. دندروگرام تجزیه خوشه‌ای به روش Ward و ضریب اقلیدسی با استفاده از نرم افزار SPSS ver19 (IBM Corp, 2011) رسم شد. تجزیه ساختار جمعیت با استفاده از نرم افزار STRUCTURE نسخه ۲,۳,۴ (Pritchard *et al.* 2000) صورت گرفت. تعداد بهینه زیر جمعیتها با استفاده از شبیه سازی محاسبه شد. پارامترهای Burn-in و MCMC (Markov Chain Monte Carlo) ۱۰۰۰۰۰۰ در نظر گرفته شد. محاسبه تعداد زیر جمعیت بهینه از روش (Evancho *et al.* 2005) صورت پذیرفت. برای انتساب افراد به زیر جمعیتها نیز پس از محاسبه درصد عضویت هر فرد در هر گروه درصد عضویت ۰/۷ یا بیش از آن ملاک تخصیص فرد به گروه در نظر گرفته شد (Spataro *et al.*, 2011).

کمیت نمونه‌های DNA از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد و دستگاه نانو دراپ Thermo استفاده شد. بررسی تنوع ژنتیکی ژرم پلاسما موجود به وسیله نه آغازگر ISSR که مشخصات آنها در جدول ۲ ذکر شده است، انجام گرفت.

اجزای واکنش PCR برای حجم ۱۵ میکرولیتر شامل یک میکرولیتر DNA با غلظت ۵۰ ng/μl، ۷/۵ میکرولیتر Master mix، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر و شش میکرولیتر آب دیونیزه بود. تکثیر در دستگاه ترموسایکلر مدل Analytik jena صورت گرفت. هر چرخه PCR شامل واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴ دقیقه، ۴۰ چرخه واسرشت سازی در دمای ۹۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، زمان اتصال آغازگر به مدت ۴۰ ثانیه با دمای مشخص شده در جدول ۲ برای هر آغازگر 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 بود.

به منظور آشکارسازی چند شکلی بین نمونه-ها، محصول PCR به چاهک‌های ژل آگارز ۱/۵ درصد منتقل شد و الکتروفورز با ولتاژ ۱۰۰ ولت انجام شد. سپس ژل به مدت ۱۵ دقیقه جهت رنگ آمیزی در محلول اتیدیوم بروماید قرار داده شد. عکس برداری از ژلها نیز با استفاده از دستگاه Quantum4 انجام گرفت. سپس چند شکلی بین ژنوتیپها با اعداد یک و صفر برای حضور و عدم حضور هر نوار امتیازدهی شد. برای تعیین اندازه

<sup>۶</sup> Analysis of Molecular Variance

## نتایج و بحث

نه آغازگر مورد استفاده در این تحقیق در مجموع ۸۴ نوار تولید نمودند که از میان آنها ۷۹ نوار چندشکل با میانگین ۸/۷ نوار به ازای هر آغازگر شناسایی شد (جدول ۲). نتایج نشان داد که درصد چندشکلی از ۱۰۰٪ برای آغازگرهای (GACT)<sub>4</sub>، (ACTG)<sub>4</sub>، (GTG)<sub>5</sub>، (CAC)<sub>5</sub> و (CAC)<sub>5</sub>AG تا ۶۶/۶۷ برای آغازگر (TGGA)<sub>4</sub> متغیر بود. میانگین تعداد آل موثر برای آغازگرهای مورد مطالعه ۱/۳۹ به دست آمد و کمترین مقدار آن برای آغازگر (CAC)<sub>5</sub>AG (۱/۱۹) و بیشترین مقدار متعلق به آغازگر (ACTG)<sub>4</sub> (۱/۶۹) بود. شناسایی و

انتخاب آغازگرهای دارای چندشکلی بالا کمک قابل توجهی در مطالعات تنوع ژنتیکی می‌نماید (Sefera et al., 2011; Torutaeva et al., 2014).  
حسن استفاده از نشانگرهای دارای چند شکلی بالا در سایر مطالعات افزایش کارایی آغازگر در برآورد تنوع ژنتیکی می‌باشد. در بررسی تنوع ژنتیکی ۱۰۵ توده نخود کابلی با استفاده از نشانگر RAPD تعداد نوارهای چند شکل از ۶ تا ۲۶ عدد گزارش شد و بیشترین و کمترین درصد چند شکلی بین نشانگرها نیز به ترتیب ۳۰/۴۳ و ۹۶/۲۹ به دست آمد (Fazeli and Chghamirza 2010).  
الگوی نواربندی آغازگر (GACA)<sub>4</sub> در شکل ۱ نشان داده شده است.

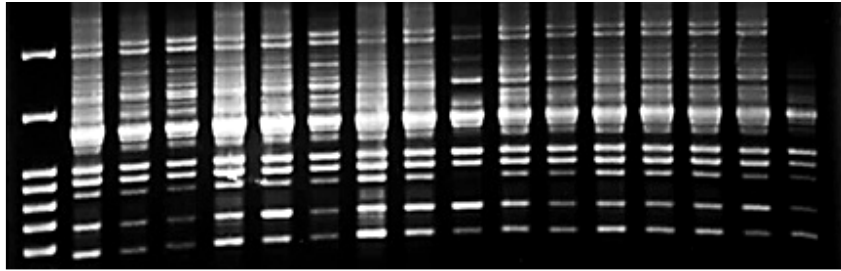
جدول ۲- برآورد تنوع ژنتیکی در ژنوتیپ های نخود کابلی مورد مطالعه برای هریک از آغازگرهای ISSR.

Table 1- Genetic diversity estimates in the studied Kabuli chickpea genotypes for each ISSR primer.

آغازگر Primer	Tm °C	N.T.B	N.P.B	Pol%	na	ne	h	I
(GACA) <sub>4</sub>	30.7	15	13	86.67	1.87	1.40	0.24	0.37
(GA) <sub>8</sub> C	30.5	14	13	92.86	1.93	1.37	0.23	0.37
(GACT) <sub>4</sub>	28.8	13	13	100.00	2.00	1.56	0.34	0.52
(ACTG) <sub>4</sub>	30.1	7	7	100.00	2.00	1.69	0.39	0.58
(GTG) <sub>5</sub>	43.3	10	10	100.00	2.00	1.46	0.29	0.45
(CAC) <sub>5</sub>	43.3	7	7	100.00	2.00	1.33	0.21	0.34
(CAC) <sub>5</sub> AG	37.8	6	6	100.00	2.00	1.19	0.15	0.27
(TCC) <sub>5</sub>	47	6	6	100.00	2.00	1.34	0.21	0.34
(TGGA) <sub>4</sub>	46.2	6	4	66.67	1.67	1.21	0.13	0.21
میانگین Average		9.33	8.78	94.02	1.94	1.39	0.24	0.38

N.T.B، تعداد کل نوارها؛ N.P.B، تعداد نوارهای چندشکل؛ Pol%، درصد چندشکلی؛ Na، تعداد آل‌های مشاهده شده؛ Ne، تعداد آل‌های موثر؛ h، ضریب تنوع ژنی نی؛ I، شاخص اطلاعات شانون.

N.T.B, number of total band; N.P.B, number of polymorphic bands; Pol%, polymorphism percentage; Na, observed number of alleles; Ne, effective number of alleles; h, Nei's gene diversity; I, Shannon's information index.



شکل ۱- الگوی نواریندی آغازگر  $(GACA)_4$  از نشانگرهای ISSR مورد مطالعه در ژنوتیپ‌های مورد بررسی.

**Figure 1-** banding pattern of primer  $(GACA)_4$  from studied ISSR marker in this survey.

(Nadari *et al.*, 2015). تنوع ژنتیکی مهمترین رکن برای شروع برنامه‌های به‌نژادی است. از این رو تنوع مشاهده شده در جمعیت‌های مورد مطالعه راه را برای تولید ارقام جدید از طریق تلاقی ژنوتیپ-های برتر با فاصله ژنتیکی زیاد هموار می‌سازد. در ادامه، پارامترهای ژنتیکی فوق برای هر یک از سه جمعیت دریافت شده از مرکز ایکاردا، ترکیه و ارقام بومی ایران محاسبه شد. در جمعیت اخذ شده از ایکاردا متوسط نوارهای به دست آمده برای آغازگرهای مورد بررسی  $9/33$  و میانگین نوارهای چندشکل  $8/44$  به دست آمد. شاخص تنوع نی و شانون در این جمعیت به ترتیب  $0/27$  و  $0/44$  به دست آمد که از میانگین کل بیشتر بود. بیشترین مقدار ضریب نی برای این جمعیت  $0/43$  و کمترین مقدار آن  $0/15$  بود (جدول ۳). اندازه‌گیری پارامترهای فوق در جمعیت به دست آمده از مبداء ترکیه در جدول ۴ آمده است.

مطالعه دیگری با استفاده از ۱۵ نشانگر SSR روی ۳۵ ژنوتیپ نخود کابلی درصد چندشکلی نشانگرهای مورد آزمایش را از ۳۳ تا ۱۰۰ درصد نشان داد (Mirderikvand, 2017). در بررسی  $125$  رقم نخود کابلی با استفاده از نشانگرهای ISSR میزان چندشکلی آغازگرهای مورد مطالعه را از  $0/26$  تا  $0/91$  متغیر بود (Aggarwal *et al.*, 2015). شاخص تنوع ژنتیکی نی برای آغازگرهای مورد بررسی به طور متوسط  $0/24$  به دست آمد که در مقایسه با سایر مطالعات تنوع متوسطی را نشان داد (Nadari *et al.*, 2015; Hajibarat *et al.*, 2016). متوسط شاخص شانون نیز  $0/38$  به دست آمد. در یک مطالعه روی ۲۳ رقم نخود به وسیله نشانگر SSR میانگین ضریب تنوع نی و شاخص شانون به ترتیب  $0/83$  و  $2/1$  به دست آمد (Torutaeva *et al.*, 2014). در مطالعه دیگری روی ۵۶ ژنوتیپ نخود کابلی به وسیله نشانگر ISSR ضریب نی و شانون به ترتیب  $0/325$  و  $0/492$  برآورد شد.

جدول ۳- برآورد تنوع ژنتیکی درون جمعیت اخذ شده از ICARDA برای هر یک از آغازگرهای مورد مطالعه.

Table 2- Genetic diversity estimates within the ICARDA population for each ISSR primer.

Primer آغازگر	Tm °C	N.T.B	N.P.B	Pol%	na	ne	h	I
(GACA) <sub>4</sub>	30.7	15	13	86.67	1.87	1.45	0.27	0.41
(GA) <sub>8</sub> C	30.5	14	13	92.86	1.93	1.48	0.29	0.44
(GACT) <sub>4</sub>	28.8	13	13	100.00	2.00	1.42	0.27	0.42
(ACTG) <sub>4</sub>	30.1	7	7	100.00	2.00	1.77	0.43	0.62
(GTG) <sub>5</sub>	43.3	10	10	100.00	2.00	1.42	0.27	0.44
(CAC) <sub>5</sub>	43.3	7	5	71.43	1.71	1.30	0.18	0.29
(CAC) <sub>5</sub> AG	37.8	6	5	83.33	1.83	1.33	0.23	0.37
(TCC) <sub>5</sub>	47	6	6	100.00	2.00	1.33	0.23	0.37
(TGGA) <sub>4</sub>	46.2	6	4	66.67	1.67	1.23	0.15	0.23
Average میانگین		9.33	8.44	88.99	1.89	1.42	0.26	0.40

N.T.B، تعداد کل نوارها؛ N.P.B، تعداد نوارهای چندشکل؛ Pol%، درصد چندشکلی؛ Na، تعداد آللهای مشاهده شده؛ Ne، تعداد آللهای موثر؛ h، ضریب تنوع ژنی نی؛ I، شاخص اطلاعات شانون.

N.T.B, number of total band; N.P.B, number of polymorphic bands; Pol%, polymorphism percentage; Na, observed number of alleles; Ne, effective number of alleles; h, Nei's gene diversity; I, Shannon's information index.

جدول ۴- برآورد تنوع ژنتیکی در جمعیت اخذ شده از ترکیه برای هر یک از آغازگرهای مورد مطالعه.

Table 3- Genetic diversity estimates within the Turkish population for each ISSR primer.

Primer آغازگر	Tm °C	N.T.B	N.P.B	Pol%	na	ne	h	I
(GACA) <sub>4</sub>	30.7	15	11	73.33	1.67	1.34	0.20	0.31
(GA) <sub>8</sub> C	30.5	14	10	71.43	1.71	1.28	0.18	0.28
(GACT) <sub>4</sub>	28.8	13	13	100.00	2.00	1.65	0.38	0.56
(ACTG) <sub>4</sub>	30.1	7	7	100.00	2.00	1.27	0.21	0.36
(GTG) <sub>5</sub>	43.3	10	9	90.00	1.90	1.47	0.28	0.42
(CAC) <sub>5</sub>	43.3	7	6	85.71	1.86	1.35	0.22	0.35
(CAC) <sub>5</sub> AG	37.8	6	4	66.67	1.67	1.11	0.09	0.18
(TCC) <sub>5</sub>	47	6	5	83.33	1.83	1.32	0.19	0.29
(TGGA) <sub>4</sub>	46.2	6	1	16.67	1.17	1.10	0.06	0.09
Average میانگین		9.33	7.33	76.35	1.76	1.32	0.20	0.32

N.T.B، تعداد کل نوارها؛ N.P.B، تعداد نوارهای چندشکل؛ Pol%، درصد چندشکلی؛ Na، تعداد آللهای مشاهده شده؛ Ne، تعداد آللهای موثر؛ h، ضریب تنوع ژنی نی؛ I، شاخص اطلاعات شانون.

N.T.B, number of total band; N.P.B, number of polymorphic bands; Pol%, polymorphism percentage; Na, observed number of alleles; Ne, effective number of alleles; h, Nei's gene diversity; I, Shannon's information index.



میانگین کل نوارها و میانگین نوارهای چند شکل در ارقام بومی مطالعه شده در این تحقیق به ترتیب ۹/۳۳ و ۵/۴۴ بود که نشان دهنده کمترین تعداد نوار چند شکل در میان توده‌های مورد مطالعه است. میانگین ضریب نی و شانون هم برای ارقام بومی به ترتیب ۰/۲ و ۰/۳ بود (جدول ۵).

متوسط پارامترهای نی و شانون در این جمعیت به ترتیب ۰/۲ و ۰/۳۲ برآورد شد. که از متوسط کل محاسبه شده و جمعیت اخذ شده از ایکاردا کمتر بود. کمترین و بیشترین مقدار ضریب نی برای جمعیت مذکور به ترتیب ۰/۰۶ و ۰/۳۸ و متعلق به آغازگرهای (TGGA)<sub>4</sub> و (GACT)<sub>4</sub> بود.

جدول ۵- برآورد تنوع ژنتیکی در ارقام بومی ایران برای هر یک از آغازگرهای ISSR مورد مطالعه.

Table 4- Genetic diversity estimates within the Iranian landraces for each ISSR primer.

Primer آغازگر	Tm °C	N.T.B	N.P.B	Pol%	na	ne	h	I
(GACA) <sub>4</sub>	30.7	15	8	53.33	1.53	1.30	0.19	0.28
(GA) <sub>8</sub> C	30.5	14	7	50.00	1.50	1.35	0.20	0.30
(GACT) <sub>4</sub>	28.8	13	8	61.54	1.62	1.32	0.20	0.31
(ACTG) <sub>4</sub>	30.1	7	7	100.00	2.00	1.56	0.35	0.53
(GTG) <sub>5</sub>	43.3	10	8	80.00	1.80	1.39	0.26	0.40
(CAC) <sub>5</sub>	43.3	7	4	57.14	1.57	1.22	0.16	0.26
(CAC) <sub>5</sub> AG	37.8	6	1	16.67	1.17	1.13	0.07	0.11
(TCC) <sub>5</sub>	47	6	3	50.00	1.50	1.36	0.20	0.30
(TGGA) <sub>4</sub>	46.2	6	3	50.00	1.50	1.26	0.17	0.26
Average میانگین		9.33	5.44	57.63	1.58	1.32	0.20	0.30

N.T.B، تعداد کل نوارها؛ N.P.B، تعداد نوارهای چندشکل؛ Pol% درصد چندشکلی؛ Na، تعداد آل‌های مشاهده شده؛ Ne، تعداد آل‌های موثر؛ h، ضریب تنوع ژنی نی؛ I، شاخص اطلاعات شانون.

N.T.B, number of total band; N.P.B, number of polymorphic bands; Pol%, polymorphism percentage; Na, observed number of alleles; Ne, effective number of alleles; h, Nei's gene diversity; I, Shannon's information index.

واریانس مولکولی تفاوت معنی‌داری را بین سه جمعیت مورد بررسی نشان داد. اما با وجود معنی‌دار شدن تفاوت بین جمعیت‌ها از کل تنوع ژنتیکی تنها ۱۰ درصد مربوط به تنوع بین جمعیت‌ها بود (شکل ۲).

در مجموع می‌توان جمعیت دریافت شده از ایکاردا را دارای بالاترین میزان تنوع ژنتیکی عنوان کرد. برای بررسی میزان تنوع بین و درون جمعیت‌های مورد بررسی از تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) استفاده شد (جدول ۶). نتیجه تجزیه

جدول ۶- تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) برای ۸۱ ژنوتیپ نخود کابلی درون و بین جمعیت ها.

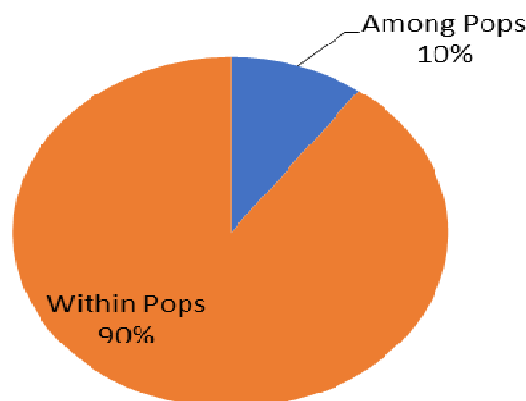
**Table 5- Analysis of molecular variance (AMOVA) for 81 Kabuli chickpea individuals among and within populations.**

Source of variation	df	SS	MS	میانگین مربعات
Among Pops	2	70.443	35.222**	بین جمعیت ها
Within Pops	78	790.767	10.138	درون جمعیت ها
Total	80	861.210		کل

\*\* معنی داری در سطح احتمال یک درصد را نشان می دهد.

\*\* indicating significant at 1% levels of probability.

### Percentages of Molecular Variance



شکل ۲- درصد واریانس مولکولی به دست آمده از AMOVA بین جمعیت های نخود کابلی.

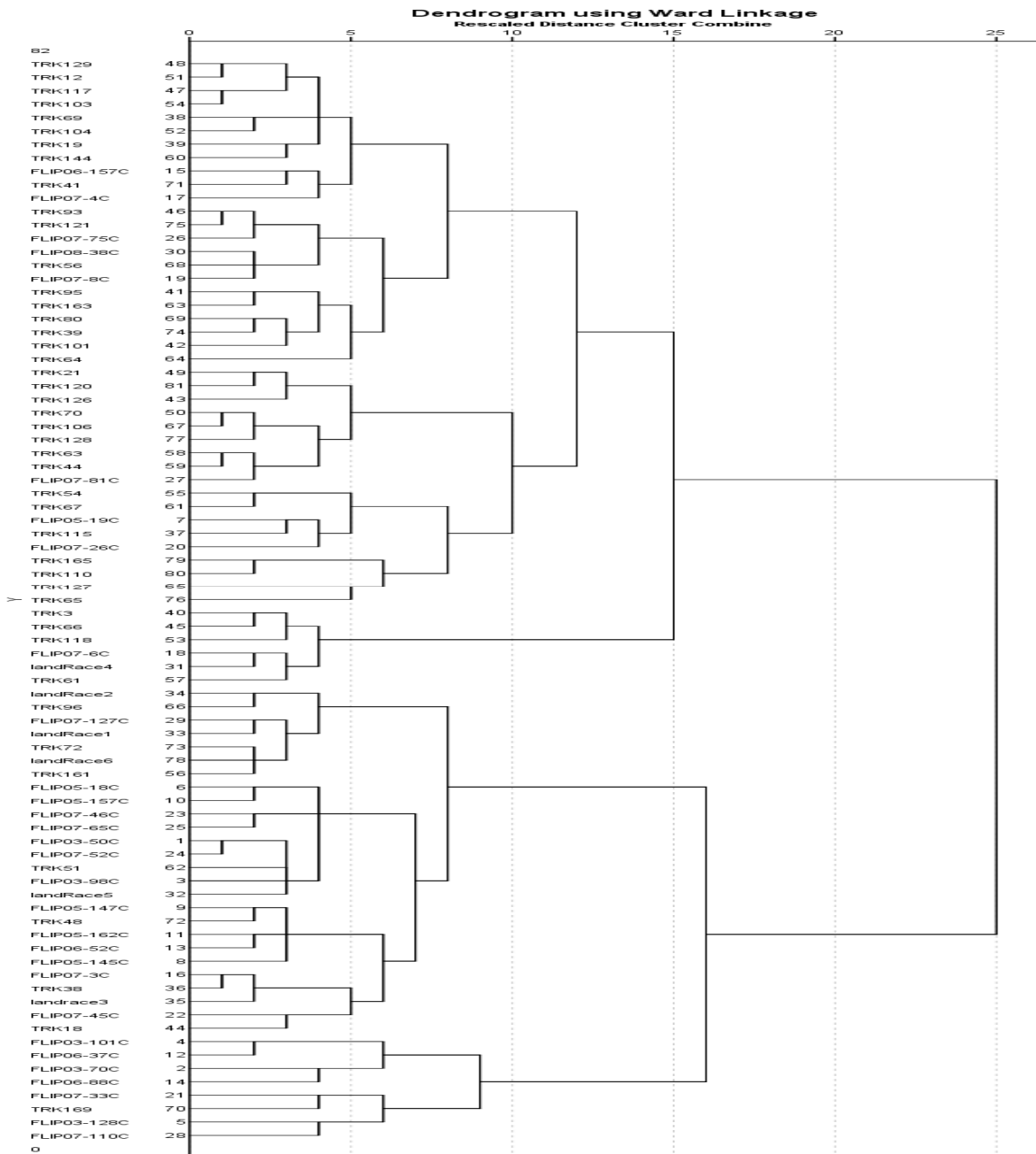
**Figure 2- Percentages of Molecular Variance of AMOVA in studied Kabuli chickpea populations.**

بومی ایران به وسیله نشانگر SSR نتایج AMOVA بر اساس گروه بندی منطقه ای ژنوتیپ ها نشان داد که تنها یک درصد تنوع ژنتیکی بین مناطق وجود داشت (Naghavi *et al.*, 2012). این مطالعات تایید کننده نتایج مطالعه حاضر می باشند. بر اساس نتایج به دست آمده مناطق جغرافیایی تاثیر چندانی بر

در مطالعه ای مشابه روی اکسشن های مختلف نخود کابلی نتایج تجزیه AMOVA نشان داد که تفاوت معنی دار میان اکسشن های نخود کابلی وجود داشت. ولی تنوع بین ژنوتیپ های نخود کابلی را ۳۸٪ کل تنوع جمعیت ها برآورد نمود (Torutaeva *et al.*, 2014). در یک بررسی دیگر روی ۳۰۷ رقم

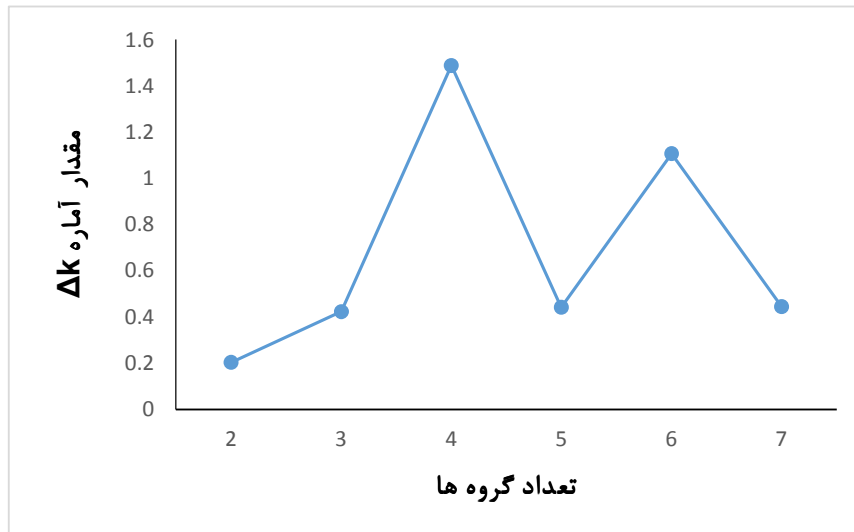
تمایز تقسیم نمود. بزرگترین و نخستین گروه شامل ۴۱ ژنوتیپ بود. اکثر ژنوتیپ‌های این گروه را ژنوتیپ‌های مبداء ترکیه تشکیل دادند. ولی هشت ژنوتیپ مبداء ایکاردا نیز در میان ژنوتیپ‌های این گروه جای گرفتند. در گروه دوم شش ژنوتیپ قرار گرفت که شامل یک رقم بومی، یک ژنوتیپ از مبداء ایکاردا و چهار ژنوتیپ از مبداء ترکیه بود. سومین گروه شامل ۲۶ ژنوتیپ بود که عمده ژنوتیپ‌های آن را ژنوتیپ‌های مبداء ایکاردا تشکیل داد. لازم به ذکر است که پنج رقم بومی باقی مانده و هفت ژنوتیپ از مبداء ترکیه نیز در این گروه قرار گرفتند. گروه آخر نیز شامل هفت ژنوتیپ به دست آمده از مرکز ایکاردا و یک ژنوتیپ از مبداء ترکیه بود. (mirderikvand (2017) در مطالعه ۳۵ ژنوتیپ نخود کابلی با استفاده از نشانگرهای SSR و گروه‌بندی ژنوتیپ‌های مورد بررسی به وسیله تجزیه خوشه‌ای اظهار داشت که روش تجزیه خوشه‌ای گروه‌بندی کاملی برای ژنوتیپ‌های اخذ شده از مبادی مختلف، انجام نداد. همچنین تجزیه به هماهنگ‌های اصلی نیز موید نتایج تجزیه خوشه-ای در تحقیق ذکر شده بود. ساختار ژنتیکی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه با نرم افزار STRUCTUR بررسی شد. برای تعیین تعداد بهینه زیر جمعیت‌ها مقدار آماره  $\Delta K$  برای تعداد زیر جمعیت‌های ۲ تا ۹ عدد محاسبه شد (شکل ۳) و بر اساس مقادیر  $\Delta K$ ، ژنوتیپ‌های مورد مطالعه به چهار گروه تقسیم شدند (شکل ۴).

تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های نخود کابلی ندارد. در تحقیقی مشابه که روی نخودهای بومی قرقیزستان انجام گرفت اشاره شد که بر خلاف بسیاری از گیاهان زراعی مانند گندم، برنج و جو گزینش خاصی توسط کشاورزان روی توده‌های نخود زراعی انجام نگرفته است (Torutaeva et al., 2014). از این رو انتقال توده‌های نخود کابلی از مبداء پیدایش و تنوع آن، بدون گزینش موثر باعث شد تا تنوع ژنتیکی توده‌های منتقل شده نخود کابلی بسیار زیاد باشد. همچنین عدم گزینش پس از انتقال نخود به نواحی جغرافیای متفاوت و وجود تبادلات احتمالی ژرم پلاسم بین مناطق مختلف نیز باعث شد تا تنوع ژنتیکی بین مناطق مختلف نسبت به تنوع ژنتیکی درون مناطق به طرز چشمگیری کمتر باشد. با توجه به سهم کم مبداء‌های جغرافیایی در تنوع ژنتیکی مشاهده شده بین ژنوتیپ‌ها، از تجزیه خوشه‌ای داده‌های مولکولی برای ایجاد گروه بندی کارآمدتر ژنوتیپ‌های مورد مطالعه استفاده شد (شکل ۳). تجزیه خوشه‌ای با روش وارد و فاصله اقلیدسی انجام شد. برای تایید صحت گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها ضریب همبستگی کوفتیک (Schaut et al, 1999) محاسبه شد که مقدار آن ۰/۷۱ به دست آمد. برخی پژوهشگران ضریب همبستگی کوفتیک بالا را نشان دهنده موثر بودن روش تجزیه خوشه‌ای در تفکیک ژنوتیپ‌ها بر اساس داده‌های مولکولی برشمرده‌اند (Tilman et al 1996). نتایج تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را به چهار گروه



شکل ۳- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های نخود کابلی بر اساس ماتریس فاصله اقلیدسی با استفاده از داده‌های ISSR.

Figure 3- Denderogram generated from cluster analysis of Kabuli chickpea genotype based on the Euclidian distance matrix using ISSR data.

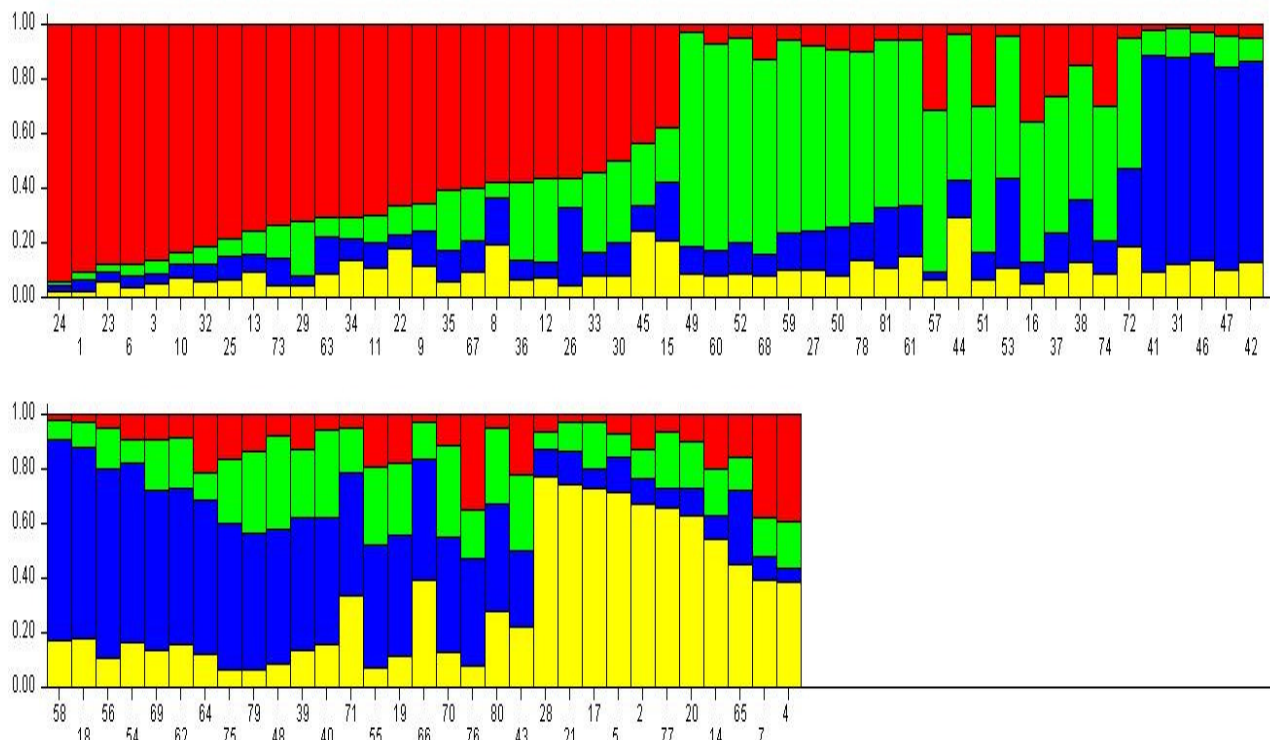


شکل ۴- نمودار دوطرفه برای تعیین تعداد بهینه گروه‌های ژنوتیپی (K).

Figure 4- bilateral chart to determine the optimal number of groups of genotypes (K).

تمایز که به ترتیب شامل ۲۱ و ۳۵ ژنوتیپ بودند توسط نرم افزار STRUCTUER تشخیص داده شدند و ۲۱ ژنوتیپ نیز به عنوان ژنوتیپ‌های مخلوط معرفی گردیدند ( Mohammadi *et al* 2014). ایجاد زیر گروه‌های مختلف در ساختار جمعیت به تفاوت‌های فراوانی آلی بین ژنوتیپ-های تشکیل دهنده جمعیت بر می‌گردد. از این رو عدم انتساب بخش عمده‌ای از ژنوتیپ‌های مورد بررسی به صورت کامل به زیر گروه‌های به دست آمده، نشان می‌دهد که به رغم وجود تنوع ژنتیکی قابل قبول در این مطالعه، بسیاری از ژنوتیپ‌های مورد مطالعه دارای ویژگی‌های ژنتیکی حدواسط گروه‌های مختلف بودند.

بر اساس میزان درصد عضویت ژنوتیپ‌ها در گروه‌های چهارگانه (جدول ۷)، گروه یک شامل ۱۴ ژنوتیپ بود که عمدتاً از ژنوتیپ‌های موسسه ایکاردا بودند. گروه دوم شامل پنج ژنوتیپ از مبدا ترکیه بودند. گروه سوم شامل هشت ژنوتیپ عمدتاً از مبدا ترکیه بود. گروه چهارم نیز شامل چهار ژنوتیپ از مبدا ایکاردا بود. ۵۰ ژنوتیپ باقی مانده نیز به طور کامل در هیچ از چهار گروه تعیین شده قرار نگرفت. از میان ژنوتیپ‌های بومی ایران سه عدد در هیچ گروهی جای نگرفت دو عدد در گروه یک و یک عدد نیز در میان ژنوتیپ‌های گروه سه قرار گرفت. در بررسی مشابهی که روی ۷۷ ژنوتیپ جو به وسیله نشانگر AFLP انجام شد، دو گروه



شکل ۵- ساختار ژنتیکی جمعیت به دست آمده از نرم افزار STRUCTURE.

Figure 5- Genetic population structure resulted from STRUCTURE software.

#### نتیجه گیری کلی

بررسی تنوع ژنتیکی به وسیله نشانگرهای ISSR نشان داد که درصد چندشکلی نشانگرها از ۶۶/۶۷ درصد تا ۱۰۰ درصد متغیر است. متوسط شاخص نی نیز ۰/۲۴ درصد به دست آمد که نشان دهنده تنوع قابل قبول در میان ژنوتیپ‌های مورد بررسی بود. پیش‌تر پژوهش‌گران معتقد بودند که تنوع ژنتیکی نخود اندک است (Iruela et al., 2002). اما مطالعه حاضر همسو با مطالعات اخیر (Ghaffari et al., 2014; Hajibarat et al., 2015) نشان داد که تنوع ژنتیکی قابل قبولی در این گیاه

دید می‌شود. تجزیه واریانس مولکولی برای مبادی دریافت ژنوتیپ‌ها به عنوان معیار گروه بندی آنها نشان داد که با وجود معنی دار شدن تفاوت بین سه مبداء مورد اشاره سهم بسیار بزرگی از تنوع، درون هر مبداء قرار داشت. نتایج تجزیه خوشه‌ای نیز نشان داد که مبداءهای متفاوت ژنوتیپ‌های مورد بررسی نمی‌تواند یک ملاک قوی برای گروه بندی ژنوتیپ‌ها باشد و ژنوتیپ‌هایی که از نظر جغرافیایی فاصله زیادی داشتند در گروه‌های یکسان قرار گرفتند.

جدول ۷- عضویت ژنوتیپ ها بر اساس نتایج به دست آمده از نرم افزار STRUCTURE.

Table 7- genotypes membership derived from STUCTURE software.

No. شماره	Q1	Q2	Q3	Q4	No. شماره	Q1	Q2	Q3	Q4
1	0.902	0.029	0.043	0.027	42	0.046	0.088	0.736	0.13
2	0.124	0.105	0.094	0.678	43	0.22	0.278	0.279	0.223
3	0.861	0.048	0.041	0.05	44	0.029	0.538	0.134	0.299
4	0.386	0.174	0.05	0.39	45	0.429	0.232	0.095	0.245
5	0.066	0.09	0.123	0.721	46	0.024	0.081	0.758	0.137
6	0.872	0.047	0.04	0.042	47	0.036	0.121	0.738	0.106
7	0.374	0.147	0.08	0.399	48	0.075	0.342	0.496	0.087
8	0.573	0.062	0.172	0.193	49	0.027	0.784	0.097	0.092
9	0.657	0.093	0.13	0.12	50	0.091	0.649	0.177	0.082
10	0.83	0.046	0.046	0.078	51	0.297	0.532	0.103	0.067
11	0.693	0.107	0.088	0.112	52	0.044	0.752	0.117	0.087
12	0.563	0.304	0.06	0.073	53	0.036	0.523	0.33	0.111
13	0.753	0.086	0.062	0.099	54	0.087	0.086	0.662	0.165
14	0.196	0.173	0.084	0.548	55	0.188	0.287	0.447	0.078
15	0.373	0.203	0.21	0.213	56	0.045	0.151	0.695	0.11
16	0.355	0.515	0.078	0.052	57	0.314	0.586	0.035	0.065
17	0.024	0.171	0.074	0.732	58	0.02	0.071	0.735	0.174
18	0.026	0.094	0.698	0.182	59	0.053	0.709	0.135	0.104
19	0.178	0.262	0.441	0.118	60	0.066	0.76	0.095	0.079
20	0.1	0.166	0.101	0.633	61	0.052	0.607	0.185	0.156
21	0.024	0.109	0.124	0.743	62	0.083	0.186	0.573	0.158
22	0.659	0.11	0.051	0.179	63	0.706	0.072	0.136	0.086
23	0.874	0.033	0.034	0.059	64	0.212	0.099	0.566	0.123
24	0.936	0.017	0.023	0.024	65	0.151	0.125	0.273	0.451
25	0.782	0.064	0.086	0.067	66	0.024	0.139	0.441	0.397
26	0.559	0.111	0.287	0.043	67	0.599	0.193	0.112	0.096
27	0.073	0.679	0.143	0.105	68	0.126	0.711	0.084	0.079
28	0.059	0.065	0.099	0.778	69	0.091	0.184	0.589	0.136
29	0.72	0.2	0.031	0.049	70	0.111	0.332	0.427	0.13
30	0.499	0.295	0.123	0.083	71	0.043	0.17	0.45	0.337
31	0.014	0.104	0.759	0.123	72	0.049	0.474	0.29	0.187
32	0.812	0.063	0.064	0.061	73	0.734	0.122	0.097	0.047
33	0.536	0.296	0.084	0.085	74	0.295	0.493	0.126	0.085
34	0.702	0.081	0.077	0.14	75	0.162	0.232	0.537	0.069
35	0.601	0.227	0.108	0.063	76	0.35	0.173	0.398	0.078
36	0.572	0.292	0.07	0.065	77	0.059	0.212	0.066	0.663
37	0.258	0.501	0.146	0.094	78	0.093	0.632	0.133	0.142
38	0.147	0.494	0.224	0.135	79	0.129	0.302	0.498	0.071
39	0.122	0.255	0.486	0.137	80	0.044	0.28	0.396	0.28
40	0.052	0.323	0.466	0.158	81	0.052	0.614	0.22	0.115
41	0.018	0.094	0.788	0.1					

Q1 درصد عضویت در گروه ۱؛ Q2 درصد عضویت در گروه ۲؛ Q3 درصد عضویت در گروه ۳؛ Q4 درصد عضویت در گروه چهارم.

Q1, membership percentage of group 1; Q2, membership percentage of group 2; Q3 membership percentage of group 3; Q4 membership percentage of group 4.

تجزیه ساختار جمعیت با استفاده از نرم افزار STRUCTURE جمعیت را به چهار گروه تقسیم نمود و ۵۱ ژنوتیپ نیز مخلوط تشخیص داده شدند. نتایج آزمایش نشان داد به رغم تنوع ژنتیکی بالا در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، فاصله جغرافیایی محل جمع آوری ژنوتیپ‌ها پارامتر تعیین کننده‌ای در تعیین ساختار ژنتیکی جمعیت‌های نخود کابلی نیست. از این رو به نظر می‌رسد مطالعات بیشتری برای درک ساختار ژنتیکی جمعیت‌های نخود کابلی لازم است.

#### منابع

- Aggarwal H, Roa A, Kumar A, Singh J, Rana SJ, Naik PK, Chhonkor V (2015). Assessment of genetic diversity among 125 cultivars of chickpea (*Cicer arietinum* L.) of indian origin using ISSR markers. Turkish Journal of Botany 39: 218-226.
- Choudhary P, Khanna SM, Jain PK, Bharadwaj C, Kumar J, Lakhera PC, Srinivasan R (2013). Molecular characterization of primary gene pool of chickpea based on ISSR markers. Biochemical genetics 51: 306-322.
- Clarke HJ, Siddique KHM (2004). Response of chickpea genotypes to low temperature stress during reproductive development. Field Crops Research 90: 323-334.
- Collard BCY, Jahufer MZZ, Brouwer J, Bandpang ECK (2005). An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concept. Euphytica 142: 169-196.
- Du JK, Yao YY, Ni ZF, Peng HR, Sun QX (2002). Genetic diversity revealed by ISSR molecular marker in common wheat, spelt, compactum and progeny of recurrent selection. Acta Genetica Sinica 29: 445-452.
- Evano G, Reganut E, Goudet J (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. Molecular Ecology 14: 2611-2620.
- FAO 2014. <http://faostat.fao.org>.
- Fazeli F, Choghamirza K (2010). Genetic variation in Iranian chickpea (*Cicer arietinum* L. Kbuli type) based on agronomic traits and RAPD marker. Seed and Plant Improvement Journal 4: 555-579 (In Persian).
- Fernandez M, Figueiras A, Benito C (2002). The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin. Theoretical and Applied Genetics 104: 845-851.
- Gautam AK, Gupta N, Bhadkariya R, Srivastava N, Bhagyawant SS (2016). Genetic Diversity Analysis in Chickpea Employing ISSR Markers. Agrotechnology 5: 2.
- Ghaffari P, Talebi R, Keshavarzi F (2014). Genetic diversity and geographical differentiation of Iranian landrace, cultivars, and exotic chickpea lines as revealed by morphological and microsatellite markers. Physiology and Molecular Biology of Plants 20: 225-233.
- Hajibarat Z, Saidi A, Hajibarat Z, Talebi R (2015). Characterization of genetic diversity in chickpea using SSR markers, Start Codon Targeted Polymorphism (SCoT) and Conserved DNA-Derived Polymorphism (CDDP). Physiology and Molecular Biology of Plants 21: 365-373.



- Hajibarat, Z, Saidi A, Talebi R (2016). Evaluation of Genetic Diversity of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Genotypes Based on Morphological Traits and CDDP and SCoT Markers Seed and plant Improvement Journal 32: 201-214.
- Huttel B, Winter P, Welsing K, Choumane W, Weigand F, Kahl G (1999). Sequence-tagged microsatellite site markers for chickpea (*Cicer areitinum* L.). Genome 42: 210-217.
- IBM Corp. Released (2011). IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp.
- Iruela M, Rubio J, Cubero JI, 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.
- Joshi SP, Gupta VS, Aggarwal RK, Ranjekar PK, Brar DS (2000). Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. Theoretical and Applied Genetics 100: 1311-1320.
- Keshavarz-Khoob MGh, Gharanjik Sh, Masoumias A, Abdollahi-Mandoalkani B (2015). Evaluation of diversity and genetic relationships among some grapevine cultivars using ISSR markers. 7:129-142.
- Keykhosravi H, Dehdari M, Masoumi A (2017). Evaluation of genetic diversity in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) genotypes using ISSR markers. Journal of Agricultural Biotechnology 9:127-141.
- Mirdrikvand R (2017) Investigation of genetic diversity among chickpea genotypes using SSR markers. Iranian Journal of Pulses Research. 8:127-137. (in Persian)
- Mohammadi Z, Sabouri A, Heydari R, Sabouri H, Falahi A, Dadras A, Mousanejad S (2014). Investigation of population structure and genetic diversity of barley genotypes using AFLP molecular markers. Cereal Research 4: 141-154 (In Persian)
- Nadari H, Shokrpour M, Asghari A, Kanouni H, Esfandiari A (2015). Study of genetic diversity of chickpea lines using ISSR markers. Iranian Journal of Field Crop Science 54: 509-519 (In Persian)
- Naghavi MR, Monfared SR, Humberto G (2012). Genetic diversity in Iranian chickpea (*Cicer arietinum* L.) landraces as revealed by microsatellite markers. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding 48: 131-138.
- Peakal R, Smouse PE (2006). GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes 6: 288-295.
- Pritchard JK, Stephens M, Rosenberg NA, Donnelly P (2000). Association mapping in structured populations. The American Society of Human Genetics 67: 170-181.
- Saghai-Maroofof MA, Soliman KM, Jorgensen RA, Allard RW (1984). Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. Proceedings of the National Academy of Sciences 81: 8014-8018.
- Samdaliri M, Saiedsharifi R. Esmailpor B (2010). Pulse Crops. Islamic Azad University the unit of Challos Publishers (In Persian).
- Schaut JW, Qi X, Stam P (1997). Association between relationship measures based on AFLP markers, pedigree data and morphological traits in barely. Theoretical and Applied Genetics 95: 1168-1169
- Singh PK, Sharma H, Srivastava N, Bhagyawant SS (2014). Analysis of genetic diversity among wild and cultivated chickpea genotypes employing ISSR and RAPD markers. American Journal of Plant Sciences 5: 676.
- SJKM (2015). Statistics of Jahad-e-Keshavarzi ministry. Theran, Iran. Available at <http://www.maj.ir/>

- Spataro G, Tiranti B, Arcaleni P, Bellucci E, Attene G, Papa R, Spagnoletti-zeuli P, Negri V (2011). Genetic diversity and Structure of Worldwide collection of *Phaseolus coccineus* L. *Theoretical and applied genetics* 122: 1281-1291.
- Tahir NAR, Karim HFH (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.
- Talebi R, Babaeian NA, Mardi M, Fayaz F, Furman BJ, Bagheri NA (2009). Phylogenetic diversity and relationship among annual *Cicer* species using random amplified polymorphic DNA markers. *General and Applied Plant Physiology* 35: 3-12.
- Talebi R, Naji AM, Fayaz F (2008). Geographical patterns of genetic diversity in cultivated chickpea (*Cicer arietinum* L.) characterized by amplified fragment length polymorphism. *Plant Soil Environment* 54: 447-452.
- Tilman D, Wedin D, Knopps J (1996). Productivity and sustainability influenced by biodiversity in grassland ecosystems. *Nature* 379: 718-729.
- Torutaeva E, Asanaliyev A, Prieto-Linde ML, Zborowska A, Ortiz R, Bryngelsson T, Garkava-Gustavsson L (2014). Evaluation of microsatellite-based genetic diversity, protein and mineral content in chickpea accessions grown in Kyrgyzstan. *Hereditas* 151: 81-90.
- Van der Maesen, LJG, Maxted, N, Javadi, F, Coles, S, Davies, AMR (2007). Taxonomy of the genus *Cicer* revisited. *Chickpea breeding and management*. CAB International, Wallingford. pp. 14-46.
- Varshney RK, Horres R, Molina, C, Nayak S, Jungmann R, Swamy P, Winter P, Jayashree B, Kahl G, Hoisington DA (2007). Extending the repertoire of microsatellite markers for genetic linkage mapping and germplasm screening in chickpea. *Journal of SAT Agricultural Research* 5: 1-3.
- Von Braun J, Virchow D (1996). Economic evaluation of biotechnology and plant diversity in developing countries. *Plant research and development* 43: 50-61.
- Wallace TC, Murray R, Zelman KM (2016). The Nutritional Value and Health Benefits of Chickpeas and Hummus. *Nutrients* 8: 766.
- Wang N, Hatcher DW, Tyler RT, Toews R, Gawalko EJ (2010). Effect of cooking on the composition of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and chickpeas (*Cicer arietinum* L.). *Food Research International* 43: 589-594.
- Yeh FC, Yang RC, Boyle T (1999). POPGENE, Version 1.31 edition. University of Alberta, Edmonton, AB, Canada.

**Assessment of genetic diversity among some Kabuli type chickpea genotypes using ISSR markers**

**Lorinejad M.<sup>1</sup>, Mohayjeji M.<sup>2\*</sup>, Abdolshahi R.<sup>3</sup>, Kazemipoor A.<sup>4</sup>, Sadeghzadeh-Ahari D.<sup>5</sup>**

<sup>1</sup>MSc Student of Plant Breeding, Department of Agronomy and plant breeding, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

<sup>2</sup>Assistant professor of Plant Breeding, Department of Agronomy and plant breeding, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

<sup>3</sup>Associated professor of Plant Breeding, Department of Agronomy and plant breeding, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

<sup>4</sup>Assistant professor of Bioinformatics, Department of Agronomy and plant breeding, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

<sup>5</sup>Assistant professor of dry Land Agriculture Research Institute, Maragheh, Iran.

**Abstract:**

Chickpea is the most important pulse crop in Iran. Since Iran is a part of the diversification center of chickpea, study of its genetic diversity is considerable. In order to assessment of genetic diversity of Kabuli chickpea genotypes, 81 Kabuli chickpea genotypes originated from ICARDA, Turkey and Iran were sown in the research field of Shahid Bahonar University of Kerman in 2014-2015 growing season. Nine ISSR primer was used to detect molecular polymorphisms among the genotypes and 79 polymorphic bands yielded from mentioned premiers. Number of effective allele varied from 1.19 (primer (CAC)<sub>5</sub>AG) to 1.69 (primer (ACTG)<sub>4</sub>). Means of Nei's genetic diversity and Shannon's index for all studied genotypes were 0.24 and 0.38 respectively. Nei's genetic diversity for ICARDA, Turkey and Iran originated populations were 0.27, 0.2 and 0.2, respectively. Shannon's index was calculated for each population as well, which were 0.44, 0.32 and 0.3, respectively. Analysis of molecular variance determined significant difference between the populations. However, only 10% of total variance accounted between populations. The result of cluster analysis divided the genotypes to four separated groups that was different from the primary regional grouping. Cluster analysis generally confirm that most of genetic variation found within the studied population as well. The population analysis using STRUCTURE software separated the population into four groups with 14, 5, 8 and 4 genotypes respectively. The rest of genotypes (51) were identified as mixed genotypes. The results of this study determined a wide genetic diversity between studied chickpea genotypes could be used for future breeding programs.

---

\* Corresponding Author: Mohayjeji M.

Tel: 09134553480

Email: mohayjeji@uk.ac.ir

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی (دوره ۱۰، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۷)

**Key words:** *Chickpea, Genetic variation, Analysis of molecular variance, ISSR marker*