

## شناسایی نشانگرهای ملکولی پیوسته با عملکرد و برخی صفات گیاهی در نخود زراعی تحت تنش خشکی

### Identification of molecular markers associated with yield and plant characteristics in chickpea under drought stress

زهرا آقاعلی<sup>۱</sup>، هادی علی پوریامچی<sup>۲</sup>، محمد رضا بی‌همتا<sup>۲</sup>، بابک عبدالحی مندولکانی<sup>۱\*</sup>

۱- به‌ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشیار، دانشگاه ارومیه

۲- به‌ترتیب دانشجوی دکتری، استاد، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج

Aghaali Z<sup>1</sup>, Alipour Yamchi H<sup>2</sup>, Bihamta MR<sup>2</sup>, Abdollahi Mandoulakani B<sup>\*1</sup>

1- Graduated MSc Student, Associate Professor, Urmia University, Urmia, Iran.

2- PhD Student, College of Agriculture and Natural Resources, University of  
Tehran, Karaj

\* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: b.abdollahi@urmia.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۳/۱۱/۳۰ - تاریخ پذیرش: ۹۴/۲/۱۵)

#### چکیده

تنش خشکی عامل اصلی کاهش تولید در گیاهان زراعی به‌خصوص نخود زراعی می‌باشد. به‌طوری‌که تنش خشکی انتهای فصل موجب کاهش بیش از ۵۰ درصدی عملکرد در این گیاه می‌شود. در این پژوهش به‌منظور شناسایی نشانگرهای پیوسته با صفات مرتبط با تحمل به خشکی در ۶۴ توده نخود زراعی از مکان‌یابی ارتباطی استفاده شد. ژنوتیپ‌ها در قالب طرح لاتیس ساده (۸ × ۸) کشت و ۱۷ صفت مختلف مرتبط با خشکی اندازه‌گیری شد. ثبت ژنوتیپ و ارزیابی ژنتیکی جمعیت با استفاده از ۱۸ آغازگر IRAP (Inter retrotransposon amplified polymorphism) و REMAP (Retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism) انجام گرفت. در کل ۱۲۹ مکان تکثیر شد که از این تعداد، ۸۸ مکان (۶۴/۳۴ درصد) در بین توده‌ها چند شکل بودند. مطالعه ساختار جمعیت با استفاده از روش Bayesian، توده‌های مورد مطالعه را در ۱۱ گروه قرار داد. میانگین شاخص تثبیت (Fst) همه گروه‌ها بیشتر از ۰/۵ بود که بیانگر تمایز قابل ملاحظه‌ای بین گروه‌ها بود. به‌منظور شناسایی نشانگرهای پیوسته با عملکرد دانه و صفات زراعی مرتبط با تنش خشکی، از مکان‌یابی ارتباطی به روش Mixed linear model (MLM) استفاده شد. با استفاده از این روش ۲۸ مکان پیوسته با ۱۷ صفت مورد مطالعه (در سطوح پنج و یک درصد معنی‌داری) در شرایط تنش خشکی شناسایی شد. صفت عرض شاخه‌های اصلی بیشترین تعداد مکان پیوسته را به خود اختصاص داد. تعدادی از مکان‌های شناسایی شده با بیشتر از یک صفت پیوسته بودند. با توجه به نتایج حاصله، می‌توان بعد از ارزیابی و تایید نشانگرهای پیوسته با صفات مورد بررسی، از آن‌ها در برنامه‌های به‌نژادی نخود به‌منظور توسعه واریته‌هایی با تحمل به خشکی بیشتر استفاده نمود.

#### واژه‌های کلیدی

تنش خشکی

روش Mixed linear model

مکان‌یابی ارتباطی

نخود زراعی

## مقدمه

نخود زراعی (*Cicer arietinum* L.) دیپلوئید ( $2n=2x=16$ ) و یکساله بوده و با حداقل ۷۵۰۰ سال قدمت، در تمام نقاط دنیا کشت می‌گردد (Van der Maesen et al. 1987). این گیاه یکی از مهم‌ترین و ارزان‌ترین محصولات غذایی در تأمین پروتئین و انرژی در کشورهای در حال توسعه بوده (Saeed et al. 2011) که علاوه بر داشتن مقدار زیادی پروتئین و کربوهیدرات (۸۰/۵ درصد وزن خشک بذر)، در مقایسه با سایر حبوبات، کلسیم، منگنز، فسفر و قندهای محلول آن بیشتر می‌باشد (Majnoun Hosseini 2008). دانه جوانه زده نخود مقدار زیادی اسید مالیک و اگزالیک دارد که برای بهبود اختلالات گوارشی مناسب است (Majnoun Hosseini 2008). عناصر ضد تغذیه‌ای آن مانند تریپسین و بازدارنده‌های کیموتریپسین (که دارای اثر چسبانندگی جریان خون می‌باشد) در مقایسه با دیگر حبوبات کمتر است (Van der Maesen et al. 1987). به‌رغم این که عملکرد نخود به‌طور بالقوه بالا می‌باشد ولی تنش‌های زیستی و غیر زیستی متعدد موجب کاهش عملکرد آن می‌شوند. از بین تنش‌های غیر زیستی، خشکی مهم‌ترین عامل محدود کننده عملکرد نخود بوده و هر ساله کاهش ۴۰ تا ۵۰ درصدی عملکرد این گیاه به علت خشکی انتهای فصل رخ می‌دهد (Ahmad et al. 2005). بر اساس گزارش فائو ۹۰ درصد از کشور ایران با متوسط بارندگی ۲۴۰ میلی‌متر در نواحی خشک و نیمه خشک قرار دارد (FAO 2011). در نتیجه افزایش دما در این مناطق، شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل که بتوانند در شرایط سخت هم عملکرد قابل قبولی داشته باشند ضروری به نظر می‌رسد. توارث کمی خشکی و اثر متقابل آن با محیط یکی از چالش‌های موجود در امر شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی است (Takeda et al. 2008). در نتیجه خشکی، اجزای عملکرد مانند تعداد غلاف، تعداد بذر، وزن بذر، کیفیت و عملکرد گیاه کاهش می‌یابد، در نخود مرحله گلدهی و تولید بذر مهم‌ترین مراحل هستند که تحت تاثیر خشکی قرار می‌گیرند (Toker et al. 2007).

در نخود بیشترین تلاش‌های انجام شده برای نقشه‌یابی صفات روی تنش‌های زیستی صورت گرفته (Varshney et al. 2012) و مطالعات کمی در رابطه با تحمل به خشکی وجود دارد

(Varshney et al. 2014). علی‌رغم تاثیر مهم اصلاح سنتی در افزایش دامنه رشدی نخود، به نظر می‌رسد استفاده از روش‌های نوین اصلاحی حاصل از افزایش دانش بشر در مورد ژنوم گیاهان در کنار روش‌های کلاسیک اصلاحی ضروری خواهد بود (Yadav and Sandhu 2007). در دو دهه اخیر، نشانگرهای مولکولی ابزار مناسبی برای مطالعه صفات پیچیده در گونه‌های گیاهی فراهم کرده‌اند و اصلاح گیاهان با تاکید بر روی شناسایی مکان‌های ژنی کنترل کننده صفات کمی (QTL) و انتخاب به کمک نشانگر (MAS)<sup>۲</sup> گسترش یافته است (Thudi et al. 2014). نقشه‌یابی مکان‌های ژنی کنترل کننده صفات کمی<sup>۳</sup> ابتدا بر روی جمعیت‌های حاصل از تلاقی دو والد مانند: F<sub>2</sub>، دابل هاپلوئید (DH)<sup>۴</sup>، لاین‌های تقریباً ایزوژنیک (NIL)<sup>۵</sup>، لاین‌های خالص نوترکیب (RIL)<sup>۶</sup> و جمعیت حاصل از تلاقی برگشتی (BC)<sup>۷</sup> که از نظر یک یا چند صفت از یکدیگر متمایز بودند، انجام می‌گرفت (Parrisseaux and Bernardo 2004; Russo et al. 2012) که به علت تعداد کم نوترکیبی در نتیجه پیوستگی ضعیف بین نشانگر و صفت، در دسترس نبودن جمعیت‌های نقشه‌یابی و احتیاج به زمان زیاد برای تولید جمعیت‌ها، این روش بطور وسیع قابل استفاده در ژرم پلاسماهای گیاهی نبود. مکان‌یابی ارتباطی<sup>۸</sup> روشی جایگزینی است که در آن نقشه‌یابی در جمعیت‌های طبیعی و بر اساس عدم تعادل لینکاژی<sup>۹</sup> انجام می‌گیرد (Moose and Mumm 2008). به‌دلیل اینکه در جمعیت‌های طبیعی نوترکیبی در طی سال‌هایتمادی تثبیت شده پیوستگی بین نشانگر و صفت قابل اطمینان خواهد بود (Parrisseaux and Bernardo 2004; Abdurakhmonov and Abdulkarimov 2008). این روش امروزه به‌طور وسیع در جمعیت‌های گیاهی (Kraakman et al. 2006; Ghavami et al. 2011; Zhang et al. 2011) و جانوری (Reich

<sup>1</sup> Quantitative trait loci<sup>2</sup> Marker-assisted selection<sup>3</sup> QTL mapping or Linkage-based mapping<sup>4</sup> Doubled haploid<sup>5</sup> Near isogenic lines<sup>6</sup> Recombinant inbred lines<sup>7</sup> Backcross<sup>8</sup> Association mapping or LD-based mapping<sup>9</sup> Linkage disequilibrium

اطمینان از میزان رطوبت خاک در مرحله تنش و تحت تنش بودن گیاه، از تانسیمتر استفاده شد. در مرحله ۹۰ درصد رسیدگی بوته‌ها، ۰/۵ متر از ابتدا و انتهای هر کرت به عنوان اثر حاشیه حذف و نمونه‌برداری از مابقی بوته‌ها صورت گرفت. ۱۷ صفت شامل تعداد روز تا ۵۰ درصد گلدهی (NDF)، تعداد روز تا ۵۰ درصد غلاف‌دهی (NDP)، تعداد شاخه‌های اصلی (NMB)، عرض شاخه‌های اصلی (MBW) (میلی‌متر)، ارتفاع بوته (PH) (سانتی‌متر)، طول غلاف (PL) (میلی‌متر)، عرض غلاف (PW) (میلی‌متر)، طول دانه (SL) (میلی‌متر)، عرض دانه (SW) (میلی‌متر)، تعداد دانه در هر غلاف (NSPPO)، تعداد دانه در هر بوته (NSPPI)، تعداد غلاف‌های پر (NFP)، وزن دانه با غلاف (SPW) (گرم)، وزن صد دانه (100SW) (گرم)، عملکرد دانه (SY) (گرم)، عملکرد بیولوژیک (BY) (گرم) و شاخص برداشت (HI) (درصد) تحت تنش خشکی اندازه‌گیری شد.

#### ارزیابی ژنتیکی

برای ثبت ژنوتیپ، از گیاهچه‌های دو هفته‌ای نمونه‌ای مخلوط از برگ‌های ۵ گیاه (قبل از اعمال تنش خشکی) از هر توده انتخاب و DNA آن‌ها به روش CTAB (Ausubel et al. 1995) در پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه ارومیه استخراج شد. کمیت و کیفیت DNAهای استخراج شده با استفاده از ژل آگارز ۰/۸ درصد و اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد. ۱۶ آغازگر IRAP و ۹۰ آغازگر REMAP که بر اساس رتروترانسپوزون‌های ایزوله شده از گونه‌های نزدیک به نخود زراعی طراحی شده بودند برای ارزیابی چندشکلی ادغامی و ثبت ژنوتیپ در توده‌های نخود استفاده شد (جدول ۲). تکثیر قطعات DNA در یک واکنش ۲۰ میکرولیتری حاوی بافر PCR ده برابر، ۰/۲ میکرومولار dNTP، ۱/۵ میلی مولار  $MgCl_2$ ، ۱۰ پیکومول آغازگر، ۰/۵ واحد آنزیم Taq DNA پلی‌مراز و ۲۰ نانوگرم DNA ژنومی در دستگاه ترموسایکلر اپندورف صورت گرفت. الگوی دمایی واکنش‌های PCR شامل واسرشت سازی اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه شامل ۴۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۰ ثانیه در ۴۸ تا ۵۸/۸ درجه سانتی‌گراد، دو دقیقه در ۷۲ درجه

به کار می‌رود. تجزیه ارتباط بین نشانگرهای SSR، SNP و <sup>۱</sup>DART و صفات موثر در تحمل به خشکی و گرما را در ۳۰۰ ژنوتیپ نخود زراعی مطالعه کردند که در نهایت ۳۱۲ نشانگر پیوسته با صفات شناسایی شد که از بین آن‌ها صفت وزن صد دانه بیشترین تعداد نشانگر پیوسته (۷۰) را به خود اختصاص داد.

نظر به اهمیت تنش خشکی در نخود و با توجه به اینکه تاکنون از مکان‌یابی ارتباطی برای شناسایی نشانگرهای مرتبط با عملکرد و صفات مهم مرتبط با مقاومت به خشکی در نخود استفاده نشده است بنابراین این پژوهش به منظور شناسایی نشانگرهای ملکولی مرتبط و پیوسته با عملکرد و برخی صفات مهم مرتبط با خشکی در نخود تحت شرایط تنش خشکی پایه‌ریزی شد. با توجه به گستردگی، داشتن توالی‌های محافظت شده، تولید چندشکلی‌های جدید و پایدار و پوشش ژنومی وسیع رتروترانسپوزون‌ها در کروموزوم‌های گیاهی (Bernet and Asins 2004; Gu et al. 2004; Kong et al. 2004)، در این پژوهش از نشانگرهای مبتنی بر رتروترانسپوزون‌ها (IRAP<sup>۲</sup> و REMAP<sup>۳</sup>) استفاده شد.

#### مواد و روش‌ها

##### مواد گیاهی و ارزیابی فنوتیپی

در این پژوهش ۶۴ ژنوتیپ نخود کابلی (ارقام کوروش و جم به عنوان شاهد استفاده شدند) از کلکسیون حبوبات پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران (کرج) (جدول ۱) انتخاب و در قالب طرح لاتیس ساده ۸ × ۸ در مزرعه تحقیقاتی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران (عرض جغرافیایی ۳۵ درجه و طول جغرافیایی ۵۰ درجه با ۱۱۱۲/۵ متر ارتفاع از سطح دریا) کاشته شدند به‌طوری‌که هر کرت آزمایشی شامل دو خط به طول دو متر و ۵۰ سانتی‌متر فاصله از یکدیگر، فاصله بذور روی خطوط ۱۰ سانتی‌متر و عمق آن‌ها حدوداً ۵ سانتی‌متر در نظر گرفته شد. در مراحل داشت، برای کنترل علف‌های هرز، وجین دستی انجام می‌گرفت. تنش خشکی به صورت قطع آبیاری از مرحله گلدهی تا پایان دوره رشد اعمال شد. برای

<sup>۱</sup> Diversity array technology

<sup>۲</sup> Inter retrotransposon amplified polymorphism

<sup>۳</sup> Retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism

جدول ۱- اسامی ۶۴ ژنوتیپ نخود کابلی مورد استفاده در این پژوهش

| کد ژنوتیپ | منشا   | علامت   | شماره ژنوتیپ | کد ژنوتیپ | منشا    | علامت | شماره ژنوتیپ |
|-----------|--------|---------|--------------|-----------|---------|-------|--------------|
|           |        | اختصاری |              |           | اختصاری |       |              |
| 534       | اردبیل | Ar1     | 12-071-06912 | 999       | کورش    | Ko33  | شاهد         |
| 490       | اردبیل | Ar2     | 12-071-04084 | 606       | ماهان   | Ma34  | 12-071-06985 |
| 59        | اردبیل | Ar3     | 12-071-02940 | 109       | ممنان   | Ma35  | 12-071-06678 |
| 642       | بم     | Ba4     | 12-071-07021 | 552       | میانه   | Mi36  | 12-071-06931 |
| 473       | درگز   | Dg5     | 12-071-04043 | 56        | شیراز   | Sh37  | 12-071-02740 |
| 474       | درگز   | Dg6     | 12-071-04053 | 345       | ترت جام | TJ38  | 12-071-03884 |
| 29        | اصفهان | Es7     | 12-071-02270 | 323       | ترت جام | TJ39  | 12-071-03852 |
| 466       | اصفهان | Es8     | 12-071-04043 | 335       | ترت جام | TJ40  | 12-071-03871 |
| 478       | اصفهان | Es9     | 12-071-04063 | 328       | ترت جام | TJ41  | 12-071-03859 |
| 36        | اصفهان | Es10    | 12-071-02316 | 325       | ترت جام | TJ42  | 12-071-03854 |
| 629       | اصفهان | Es11    | 12-071-07007 | 370       | ترت جام | TJ43  | 12-071-03916 |
| 492       | FAO    | Fa12    | 12-071-04091 | 403       | ترت جام | TJ44  | 12-071-03753 |
| 23        | قزوین  | Qa13    | 12-071-01837 | 356       | ترت جام | TJ45  | 12-071-03899 |
| 38        | قوچان  | Qu14    | 12-071-02351 | 369       | ترت جام | TJ46  | 12-071-03915 |
| 998       | جم     | Ja15    | شاهد         | 394       | ترت جام | TJ47  | 12-071-03946 |
| 308       | جیرفت  | Ji16    | 12-071-03833 | 375       | ترت جام | TJ48  | 12-071-03922 |
| 318       | جیرفت  | Ji17    | 12-071-03846 | 357       | ترت جام | TJ49  | 12-071-03900 |
| 317       | جیرفت  | Ji18    | 12-071-03845 | 130       | ترت جام | TJ50  | 12-071-03885 |
| 307       | جیرفت  | Ji19    | 12-071-03832 | 555       | ارومیه  | Ur51  | 12-071-06934 |
| 269       | جیرفت  | Ji20    | 12-071-03788 | 525       | ارومیه  | Ur52  | 12-071-06903 |
| 306       | جیرفت  | Ji21    | 12-071-03831 | 512       | ارومیه  | Ur53  | 12-071-06889 |
| 259       | جیرفت  | Ji22    | 12-071-03776 | 511       | ارومیه  | Ur54  | 12-071-06888 |
| 289       | جیرفت  | Ji23    | 12-071-03811 | 508       | ارومیه  | Ur55  | 12-071-06885 |
| 284       | جیرفت  | Ji24    | 12-071-03805 | 239       | ارومیه  | Ur56  | 12-071-03753 |
| 245       | جیرفت  | Ji25    | 12-071-03760 | 236       | ارومیه  | Ur57  | 12-071-03750 |
| 12        | کرج    | Ka26    | 12-071-01952 | 198       | ارومیه  | Ur58  | 12-071-03703 |
| 2         | کرج    | Ka27    | 12-071-01834 | 235       | ارومیه  | Ur59  | 12-071-03749 |
| 22        | کرج    | Ka28    | 12-071-02090 | 187       | ارومیه  | Ur60  | 12-071-03686 |
| 16        | کرج    | Ka29    | 12-071-01972 | 233       | ارومیه  | Ur61  | 12-071-03746 |
| 154       | کرج    | Ka30    | 12-071-03641 | 216       | ارومیه  | Ur62  | 12-071-03725 |
| 120       | کرج    | Ka31    | 12-071-03585 | 129       | ارومیه  | Ur63  | 12-071-03746 |
| 563       | خوی    | Kh32    | 12-071-06942 | 128       | ارومیه  | Ur64  | 12-071-03718 |

کد و شماره ژنوتیپ‌ها در بانک ژن پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

سانتی‌گراد و تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. الکتروفورز محصولات PCR در ژل آگارز ۱/۸ درصد و بافر TBE<sup>۱</sup> نیم برابر در ولتاژ ثابت ۶۵ ولت به مدت ۳ ساعت انجام شد. برای رنگ‌آمیزی ژل‌ها از اتیدیوم بروماید استفاده شد. تجزیه‌های آماری

باندهای حاصل از هر دو نشانگر به صورت یک (حضور) و صفر (عدم حضور) امتیازدهی و ماتریس حاصل برای بررسی ساختار

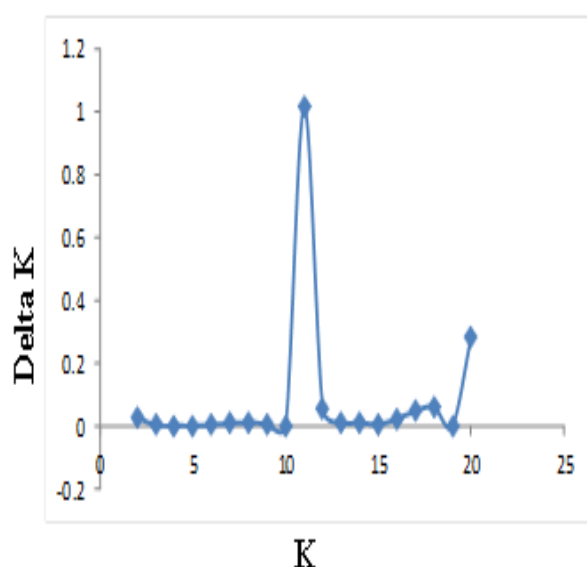
<sup>1</sup> Tris base - boric Acid - EDTA

جمعیت استفاده شد. ساختار جمعیت و تعداد زیرجمعیت‌های احتمالی بر اساس داده‌های حاصل از تلفیق دو نشانگر با استفاده از نرم افزار STRUCTURE 2.3.4 و مدل Bayesian (Pritchard et al. 2000) در حالت Admixture با ۵۰۰۰۰ بار Burn-in و ۵۰۰۰۰ بار تکرار MCMC در مقادیر مختلف K از ۱ تا ۲۰ (۱۰ تکرار برای هر K) تعیین شد. ماتریس سهم عضویت (Q) و همچنین میانگین شاخص تثبیت (FST) برای زیرگروه‌های احتمالی نیز با استفاده از همین نرم افزار برآورد گردید.

جدول ۲- نام و توالی آغازگرهای رتروترانسپوزونی و ISSR مورد استفاده

| آغازگر                      | منبع                                          | توالی (۵'-۳')             |
|-----------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------|
| CARE1-LTR2 (رتروترانسپوزون) | <i>Cicer arietinum</i> (Rajput et al. 2009)   | agtggactttacgaatgcttgag   |
| TPS12a (رتروترانسپوزون)     | <i>Pisum sativum</i> (Pearce et al. 2000)     | gggctttgactaatggacctc     |
| TPS19 (رتروترانسپوزون)      | <i>Pisum sativum</i> (Pearce et al. 2000)     | ggagtagaagtagagagcc       |
| Tms1Ret1 (رتروترانسپوزون)   | <i>Medicago sativa</i> (Porceddu et al. 2002) | cggttttgtgggtgtgttaggccca |
| LORE1 (رتروترانسپوزون)      | <i>Lotus japonicus</i> (Fukai et al. 2008)    | gagtcttgagtaaccaactaac    |
| LORE2 (رتروترانسپوزون)      | <i>Lotus japonicus</i> (Fukai et al. 2008)    | cagcttgaggacaagctgagtc    |
| (ISSR) A7                   |                                               | agagagagagagagagagagt     |
| (ISSR) A12                  |                                               | gagagagagagagacc          |
| (ISSR) 430                  |                                               | gtgggtgggtgggtgggtga      |
| (ISSR) 443                  |                                               | acacacacacacacact         |
| (ISSR) UBC815               |                                               | ctctctctctctctt           |
| (ISSR) UBC825               |                                               | acacacacacacact           |
| (ISSR) UBC840               |                                               | gagagagagagagagaYt        |
| (ISSR) UBC857               |                                               | acacacacacacacYg          |
| (ISSR) UBC862               |                                               | agcagcagcagcagcagc        |
| (ISSR) UBC867               |                                               | ggcggcggcggcggcggcggc     |

ژنتیکی ۱۰۵ توده نخود کابلی با استفاده از نشانگرهای RAPD صفات زراعی چندشکلی نسبتاً بالایی (۵۶/۵۵ درصد) را گزارش کردند. در بررسی ساختار جمعیت بر اساس مقادیر LnP (D) و Delta K ( $\Delta K$ )، ۱۱ زیر جمعیت (شکل ۱) در بین ۶۴ توده مورد استفاده مشخص شد (شکل ۲).



شکل ۱- نمودار دو بعدی K و Delta K برای تعیین تعداد زیرگروه‌های احتمالی در ۶۴ توده نخود زراعی. با توجه به شکل، تعداد زیر جمعیت‌های احتمالی ۱۱ ( $K=11$ ) می‌باشد.

عدد K بهینه (تعداد زیرجمعیت‌های احتمالی) براساس روش Delta K (Evanno et al. 2005) با استفاده از نرم افزار STRUCTURE HARVESTER (Earl et al. 2010) تعیین شد. ماتریس روابط خویشاوندی افراد (ماتریس Kinship) و تجزیه ارتباط به روش مدل خطی مخلوط (MLM)<sup>۱</sup> با نرم‌افزار TASSEL 3 انجام گرفت (Bradbury et al. 2007) و نشانگرهای پیوسته با صفات مورد بررسی در سطح معنی دار یک درصد و ۵ درصد مشخص شد. در مدل MLM علاوه بر ساختار جمعیت (ماتریس Q)، روابط خویشاوندی بین افراد جمعیت (ماتریس K) نیز در تجزیه ارتباط به‌عنوان متغیر کمکی<sup>۲</sup> در نظر گرفته می‌شود و بنابراین ارتباطات و پیوستگی‌های دروغین بین نشانگر و صفت به حداقل می‌رسد (Yu et al. 2006; Zhang et al. 2012).

## نتایج و بحث

از بین آغازگرهای مورد استفاده، ۱۸ آغازگر (۳ آغازگر منفرد IRAP و ۱۵ ترکیب آغازگری REMAP) (جدول ۲) الگوی بانندی چندشکل و قابل امتیازدهی تولید کردند. در کل ۱۲۹ مکان تکثیر شد که از این تعداد، ۸۸ مکان (۶۴/۳۴ درصد) چندشکل بودند. (Fazeli and Chaghmirza 2011) نیز در بررسی تنوع

<sup>۱</sup> Mixed linear model

<sup>۲</sup> Covariate

معنی دار ۰/۰۱ و ۰/۰۵ پیوستگی نشان دادند (جدول ۴). مقدار شاخص  $R^2$  از ۰/۰۴ تا ۰/۱۷ متغیر بود. با توجه به اینکه مکان LORE1-UBC857i بیشترین مقدار  $R^2$  را دارا بود پس می‌توان گفت که ۱۷ درصد از تنوع فنوتیپی صفت عرض شاخه‌های اصلی (MBW) توسط این مکان توجیه می‌شود. با توجه به اینکه صفت تحمل به خشکی جزو صفات کمی بوده و توسط تعداد زیادی ژن با اثرات کم کنترل می‌شود، به نظر می‌رسد که هر کدام از مکان‌های مورد مطالعه سهم کمی در توجیه تنوع فنوتیپی مشاهده شده در صفات مورد بررسی داشته باشند (Wang et al. 2011). کم‌ترین میزان P مربوط به مکان LTR2-UBC815a بود که نشانگر پیوستگی شدید بین این مکان و صفت تعداد دانه در هر غلاف (NSPPo) می‌باشد. صفت عرض شاخه‌های اصلی (MBW) بیشترین تعداد نشانگر (۷ نشانگر) پیوسته را به خود اختصاص داد. نتایج حاصله با نتایج (Thudi et al. 2014) که وزن هزار دانه بیشترین تعداد مکان پیوسته را به خود اختصاص داد مغایر بود. این تفاوت ممکن است به دلیل نوع نشانگرهای مورد استفاده و اندازه جمعیت در هر تحقیق باشد. Rashidi Monfared (2008) et al. با استفاده از نشانگرهای SSAP، ۳۲ نشانگر را در گندم شناسایی کردند که حداقل با یکی از صفات زراعی مورد بررسی رابطه معنی‌داری داشت. (Abdollahi Mandoulakani et al. 2010). برای شناسایی نشانگرهای مثبت مرتبط با صفات مورفولوژیک در بادام زمینی از تجزیه ارتباط با استفاده از نشانگرهای SSR استفاده کردند و بیان کردند که این روش برای شناسایی مکان‌های آگاهی بخش مرتبط با صفات مورفولوژیک، مفید و مطمئن بوده و نشانگرهای مؤثر حاصل از این مطالعات می‌توانند در برنامه‌های گزینش به کمک نشانگر و تهیه جمعیت‌های نقشه‌یابی استفاده شوند. چهار نشانگر با صفات طول غلاف (PL) و تعداد روز تا ۵۰ درصد غلاف دهی (NDP) و ۵ نشانگر با صفات عملکرد بیولوژیک (BY)، تعداد روز تا ۵۰ درصد گلدهی (NDF) و تعداد شاخه‌های اصلی (NMB) پیوسته بودند. از آنجاکه زودرسی یکی از اهداف مهم به نژادی در نخود بوده و در بسیاری از مناطق، کوتاهی روز تا گلدهی و بلوغ زودرس یک امتیاز محسوب شده (Singh and Saxena 1990; Siddique et al. 2003)

جدول ۳- میانگین Fst مربوط به زیر گروه‌های احتمالی ( $K=11$ ) بر اساس ۱۲۹ مکان تکثیری IRAP و REMAP در ۶۴ توده نخود زراعی

| گروه‌ها | شاخص تثبیت ( $F_{ST}$ ) | گروه‌ها | شاخص تثبیت ( $F_{ST}$ ) |
|---------|-------------------------|---------|-------------------------|
| ۱       | ۰/۶۷                    | ۷       | ۰/۶۱                    |
| ۲       | ۰/۷۶                    | ۸       | ۰/۸۱                    |
| ۳       | ۰/۵۸                    | ۹       | ۰/۶۰                    |
| ۴       | ۰/۶۸                    | ۱۰      | ۰/۵۶                    |
| ۵       | ۰/۶۹                    | ۱۱      | ۰/۶۲                    |
| ۶       | ۰/۸۸                    |         |                         |

گروه دهم با داشتن ۹ توده بیشترین درصد (۱۴/۰۶) و گروه اول با دو توده کمترین درصد (۳/۱۲) را به خود اختصاص دادند. با بررسی گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس ماتریس Q می‌توان دریافت که توده‌هایی با منشا جغرافیایی مشابه در کنار یکدیگر قرار نگرفتند. این نتایج ممکن است به دلیل جابه‌جایی ژنوتیپ‌ها از منطقه اصلی به سایر بخش‌های کشور و عمدتاً بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی بوده که این امر لزوم دقت در زمان نام‌گذاری نمونه‌ها و همچنین لزوم استفاده همزمان از اطلاعات مولکولی و مورفولوژیکی را در ایجاد کلکسیون آشکار می‌سازد. تعداد زیادی از توده‌های مورد مطالعه (۱۳ توده) در گروه مشخصی قرار نگرفتند. شاخص تمایز زیر جمعیت‌ها ( $F_{ST}$ ) از ۰/۵۶ (گروه ۱۰) تا ۰/۸۸ (گروه ۶) متغیر و برای همه زیر گروه‌های احتمالی بیشتر از ۰/۵ بود که بیانگر تمایز بالای زیر گروه‌ها از همدیگر می‌باشد (جدول ۳).

به‌منظور شناسایی نشانگرهای پیوسته با صفات در مکان‌یابی ارتباطی، از دو روش مدل خطی عمومی (GLM) و مدل خطی مخلوط (MLM) استفاده می‌شود. در مدل MLM علاوه بر ساختار جمعیت، روابط خویشاوندی بین افراد جمعیت نیز در تجزیه ارتباط به‌عنوان متغیر کمکی در نظر گرفته می‌شود و بنابراین پیوستگی‌های دروغین بین نشانگر و صفت کاهش می‌یابد (Yu et al. 2006; Zhang et al. 2012). در این مطالعه برای شناسایی نشانگرهای پیوسته با صفات مورد مطالعه و حذف پیوستگی‌های دروغین نشانگر- صفت از روش MLM استفاده شد. از ۱۲۹ نشانگر تکثیری، ۲۸ نشانگر با ۱۷ صفت در سطح

<sup>1</sup> General linear model

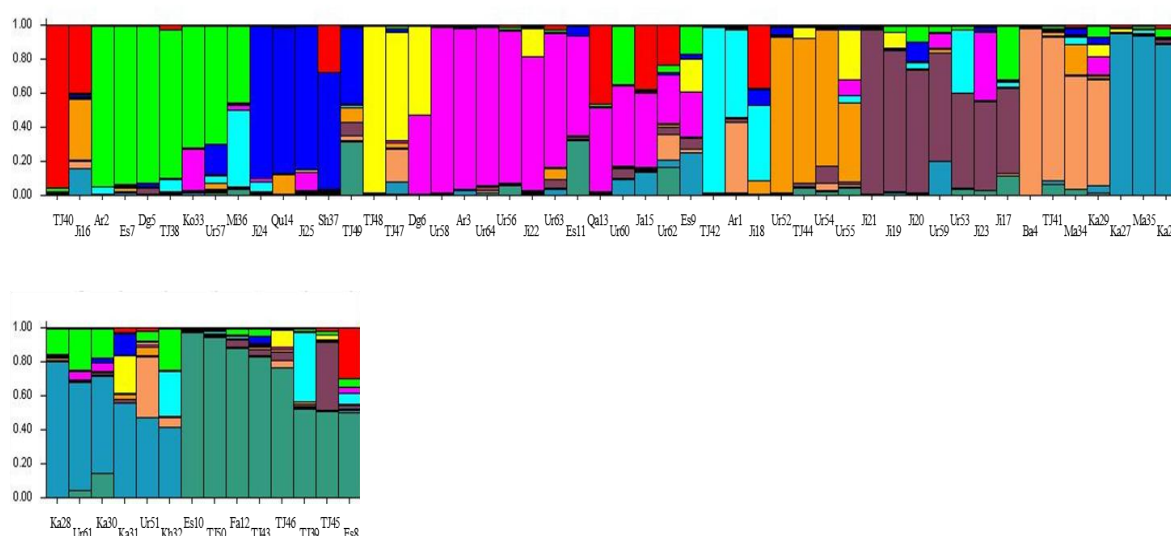
ادامہ جدول ۴-

|       |                       |                  |       |
|-------|-----------------------|------------------|-------|
| •/•٦١ | •/•٤٧                 | LORE1-UBC840a    | NDP   |
| •/•٩٩ | •/•١٢                 | Tms1RET1-A12f    |       |
| •/١١١ | •/•٠٨ <sup>⊗⊗,*</sup> | Tms1RET1-A12d    |       |
| •/١٣٩ | •/•٠٦ <sup>⊗⊗,*</sup> | TPS12a-UBC825j   |       |
| •/•٧٣ | •/•٣٨                 | TPS12a-UBC862f   | NMB   |
| •/•٨٤ | •/•٢٦                 | LTR2-UBC862f     |       |
| •/•٨٧ | •/•٢٤                 | TPS19-UBC840d    |       |
| •/•١٠ | •/•١٧                 | Tms1RET1-A12b    |       |
| •/١٠١ | •/•١٥                 | LTR2-UBC815a     |       |
| •/•٨٦ | •/•١٧                 | LORE1-UBC857a    | NSPPI |
| •/•٩٩ | •/•٠٨                 | LTR2-UBC862b     |       |
| •/•٤٠ | •/•٣٨                 | Tms1RET1-UBC840c | NSPPo |
| •/•٤١ | •/•٤٥                 | Tms1RET1-A7d     |       |
| •/•٩٥ | •/•٠٢ <sup>⊗⊗,*</sup> | LTR2-UBC815a     |       |
| •/•٧٩ | •/•٢٩                 | LTR2-UBC862f     | PH    |
| •/•٩٣ | •/•٢١                 | Tms1RET1-A7a     |       |
| •/١٢٤ | •/•٠٨ <sup>⊗⊗,*</sup> | Tms1RET1-A12b    |       |
| •/•٦٩ | •/•٤٤                 | Tms1RET1-A7a     | PL    |
| •/•٧٤ | •/•٣٤                 | LTR2-UBC862i     |       |
| •/•٧٩ | •/•٣٦                 | Tms1RET1-443a    |       |
| •/•٧٩ | •/•٢٩                 | Tms1RET1-UBC840d |       |
| •/•٧٧ | •/•٣٥                 | Tms1RET1-A7a     | PW    |
| •/•٧٧ | •/•٤١                 | Tms1RET1-443a    |       |
| •/•٥٧ | •/•٤٥                 | TPS12a-1         | SL    |
| •/•٦٨ | •/•٢٩                 | Tms1RET1-UBC825c |       |

ادامہ جدول ۴-

|       |       |               |     |
|-------|-------|---------------|-----|
| •/•٦٢ | •/•٤٧ | LTR2-UBC862f  |     |
| •/•٧• | •/•٣• | LTR2-UBC862b  | SPW |
| •/•٧• | •/•٣• | Tms1RET1-A7a  |     |
| •/•٦٧ | •/•٤٩ | TPS12a-1      |     |
| •/•٧٣ | •/•٣٨ | LORE1-UBC857a | SW  |

\*\* و \* به ترتیب معنی دار در سطح احتمال پنج و یک درصد



شکل ۲- گروه‌بندی ۶۴ ژنوتیپ نخود زراعی بر اساس تجزیه خوشه‌ای مبتنی بر مدل Bayesian با استفاده از ۱۲۹ مکان IRAP و REMAP. هر رنگ یک زیرگروه را نشان می‌دهد. محور عمودی نشان دهنده ضریب تعلق هر توده به زیر گروه و محور افقی نام توده‌های مورد مطالعه را نشان می‌دهد.

چندین QTL هم‌مکان یا چند اثر نشان می‌دهد که صفت تحمل به خشکی جزو صفات کمی می‌باشد و این امکان شناسایی مناطق ژنومی صفات مرتبط با تحمل به خشکی را فراهم می‌آورد (Thudi et al. 2014)، مکان‌هایی که با بیش از یک صفت پیوسته می‌باشند می‌توانند در به‌نژادی هم‌زمان چند صفت از طریق گزینش به کمک نشانگر مورد استفاده قرار گیرند. البته لازم است به‌منظور تایید و اطمینان آماری بیشتر به نتایج حاصل، تکرارپذیری نشانگرهای پیوسته در جمعیت‌های بزرگ‌تر با استفاده از یادداشت‌برداری از صفات مورد مطالعه در چندین مکان صورت گیرد و سپس از نشانگرهای تاییدشده در برنامه‌های به-نژادی نخود به منظور توسعه واریته‌هایی با تحمل به خشکی بیشتر و انتخاب به کمک نشانگر استفاده شود که این مهم در ادامه این تحقیق در حال انجام است.

و علاوه بر این یکی از مکانیسم‌های فرار از تنش خشکی است (Gaur et al. 2008)، بنابراین نشانگرهای پیوسته با صفات تعداد روز تا ۵۰ درصد غلاف دهی (NDP) و تعداد روز تا ۵۰ درصد گلدهی (NDF) بعد از تایید و ارزیابی در جمعیت‌های بزرگ با استفاده از داده‌های فنوتیپی چند ساله می‌توانند در برنامه‌های به‌نژادی نخود برای غربال جمعیت به‌منظور گزینش ژنوتیپ‌هایی با زمان غلاف دهی و گلدهی کوتاه‌تر و در نتیجه تحمل به خشکی بیشتر موثر باشند. نشانگرهای LTR2-UBC862f، Tms1RET1-A7a و UBC862b در بین صفات عملکرد دانه (SY)، وزن دانه با غلاف (SPW)، عملکرد بیولوژیک (BY) و عرض شاخه‌های اصلی (MBW) مشترک بودند. با توجه به این که این صفات همبستگی مثبت و معنی داری با یکدیگر داشتند (Mohammad Alipour Yamchi et al. 2011). بنابراین می‌توان گفت که مکان‌های مشترک برای صفات مذکور احتمالاً ناشی از اثر پلیوتروپی و یا پیوستگی بین مکان‌های ژنی کنترل کننده صفات مورد نظر باشد و فرضیه هم‌مکانی یا چند اثره بودن QTLها را تقویت می‌کند (Thudi et al. 2014)، هم‌مکانی QTLها راه مناسبی را برای درک اساس مولکولی تحمل به تنش خشکی و یا صفات مربوط به پاسخ به خشکی در اختیار می‌گذارد. وجود

## منابع

- Rashidi Monfared S, Mardi M, Hosseinzadeh AH, Naghavi M (2008) Association analysis between important agronomic traits and SSAP markers in durum wheat. *Modern Genetics Journal* 3: 29-35. (In Farsi)
- Abdollahi Mandoulakani B, Alami A, Esfahani M (2010) Association analysis for morphological traits in peanut (*Arachis hypogea* L.) using microsatellite markers. *Iranian Journal of Crop Sciences* 12: 510-519. (In Farsi)
- Abdurakhmonov IY, Abdulkarimov A (2008) Application of association mapping to understanding the genetic diversity of plant germplasm resources. *International Journal of Plant Genomes* 2008:1-18.
- Abdurakhmonov IY, Kohel RJ, Yu JZ, Pepper AE, Abdullaev AA, Kushanov FN, Salakhutdinov IB, Buriev ZT, Saha S, Scheffler BE, Jenkins JN, Abdulkarimov A (2008) Molecular diversity and association mapping of fiber quality traits in exotic *G. hirsutum* L. germplasms. *Genomics* 92: 478-487.
- Ahmad F, Gaur PM, Croser J (2005) Chickpea (*Cicer arietinum* L.) In: Singh RJ, Jauhar PP eds. Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement - grain legumes. CRC Press, pp 187-217.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K, Albright LM, Coen DM, Varki AA (1995) Current protocols in molecular biology. John Wiley and Sons, New York.
- Bernet GP, Asins MJ (2004) Identification and genomic distribution of gypsy like retrotransposons in Citrus and Poncirus. *Theoretical and Applied Genetics* 108: 121-130.
- Bradbury PJ, Zhang Z, Kroon DE, Casstevens TM, Ramdoss Y, Buckler ES (2007) TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics* 23: 2633-2635.
- Earl DA, Louie KD, Bardeleben C, Swift CC, Jacobs DK (2010) Rangewide microsatellite phylogeography of the endangered tidewater goby, *Eucyclogobius newberryi* (Teleostei: Gobiidae), a genetically subdivided coastal fish with limited marine dispersal. *Conservation Genetics* 11: 103-114.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611-2620.
- FAO (2010) FAOSTAT. Available in <http://faostat.fao.org/> [28 May 2010].
- Fazeli F, Chaghamirza K (2011) Genetic variation in Iranian chickpea (*Cicer arietinum* L. Kabuli type) based on agronomic traits and RAPD marker. *Plantlet and Seed Improvement Journal* 1: 555-579. (In Farsi)
- Ghavami F, Elias EM, Mamidi S, Ansari O, Sargolzaei M, Adhikari T, Mergoum M, Kianian SF (2011) Mixed model association mapping for Fusarium head blight resistance in Tunisian derived durum wheat populations. *G3: Genes/Genomes/Genetics* 1: 209-218.
- Gaur PM, Kumar J, Gowda CLL, Pande S, Siddique KHM (2008) Breeding chickpea for early phenology: Perspectives progress and prospects. In: Kharkwal MC ed. Food legumes for nutritional security and sustainable agriculture. Indian Society of Genetics and Plant Breeding pp 39-48.
- Gu YQ, Coleman-Derr D, Kong X, Anderson OD (2004) Rapid genome evolution revealed by comparative sequence analysis of orthologous regions from four Triticeae genomes. *Plant Physiology* 135: 459-470.
- Kong XY, Gu YQ, You FM, Dubcovsky J, Anderson OD (2004) Dynamics of the evolution of orthologous and paralogous portions of a complex locus region in two genomes of allopolyploid wheat. *Plant Molecular Biology* 54: 55-69.
- Kraakman ATW, Martínez F, Mussiraliev B, Van Eeuwijk FA, Niks RE (2006) Linkage disequilibrium mapping of morphological, resistance, and other agronomically relevant traits in modern spring barley cultivars. *Molecular Breeding* 17: 41-58.
- Majnoun Hosseini N (2008) Legumes agriculture and production. The university press center, Tehran, Iran 103-129. (In Farsi)
- Mohammad Ali Pour Yamchi H, Bihanta MR, Peighambari SA, Naghavi MR, Shafiee Khorshidi M (2011) Evaluation of genetic diversity and classification of Kabuli chickpea genotypes in late season drought stress. *Journal of Plant Breeding* 3(7): 54-70. (In Farsi)
- Moose SP, Mumm RH (2008) Molecular plant breeding as the foundation for 21st century crop improvement. *Plant Physiology* 147: 969-977.
- Parrisseau B, Bernardo R (2004) In silico mapping of quantitative trait loci in maize. *Theoretical and Applied Genetics* 109: 508-514.
- Patel BD, Patel VJ, Patel JB, Patel RB (2006) Effect of fertilizers and weed management practices on weed control in chickpea (*Cicer arietinum* L.) under middle Gujarat conditions. *Indian Journal of Crop Science* 1: 180-183.
- Pearce SR, Knox M, Ellis THN, Flavell AJ, Kumar A (2000) Pea Ty1-copia group retrotransposons: transpositional activity and use as markers to study genetic diversity in pisum. *Molecular Genetics and Genomics* 263: 898-907.
- Pritchard JK, Stephanes M, Rosenberg NA, Donnelly P (2000) Association mapping in structured populations. *American Journal of Human Genetics* 67: 170-181.
- Reich DE, Cargill M, Bolk S, Ireland J, Sabeti PC, Richter D, Lavery J, Kouyoumjian T, Farhadian R, Ward S, Lander R (2001) Linkage disequilibrium in the human genome. *Nature* 411: 199-204.
- Russo MA, Ficco DBM, Marone D, De Vita P, Vallega V, Pasam RK, Sharma R, Malosetti M, van Eeuwijk FA, Haseneyer G (2012) Genome-wide association studies for agronomical traits in a worldwide spring barley collection. *BMC Plant Biology* 12: 16.
- Saeed A, Hovsepyan H, Darvishzadeh R, Imtiaz M, Panguluri SK, Nazaryan R (2011) Genetic diversity of Iranian accessions, improved lines of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) and their wild relatives by using simple sequence repeats. *Plant Molecular Biology Reporter* 29: 848-858.

- Siddique KHM, Loss SP, Thomsons BD (2003) Cool seasons grain legume in dry land Mediterranean environment of Western Australia: Significance of early flowering. pp: 151-163. In: N.P. Saxena (Ed.), Management of Agriculture Drought "Agronomic and Genetic Options". Science Publishers Inc, NH, USA.
- Singh KB, Saxena MC, (1990) Studies on drought tolerance. Annual Report, ICARDA, Aleppo, Syria. pp: 108-113.
- Takeda S, Matsuoka M (2008) Genetic approaches to crop improvement: responding to environmental and population change. Nature 9: 444-457.
- Thudi M, Upadhyaya HD, Rathore A, Mal Gaur P, Krishnamurthy L, Roorkiwal M, Nayak SN, Kumar Chaturvedi S, Sarathi Basu P, Gangarao NVPR, Fikre A, Kimurto P, Sharma PC, Sheshashayee MS, Tobita S, Kashiwagi J, Ito O, Killian A, Kumar Varshney R (2014) Genetic Dissection of Drought and Heat Tolerance in Chickpea through Genome-Wide and Candidate Gene-Based Association Mapping Approaches. PLoS ONE 9: e96758.
- Toker C, Lluch C, Tejera NA, Serraj R, Siddique KHM (2007) Abiotic stresses In: Yadav SS, Redden R, Chen W, Sharma B eds. Chickpea breeding and management. CAB International, pp 474-496.
- Van der Maesen LJG, Singh KB, Saxena MC (1987) Origin, history and taxonomy of chickpea. International Publication pp: 11-34.
- Varshney RK, Kudapa H, Roorkiwal M, Thudi M, Pandey MK (2012) Advances in genetics and molecular breeding of three legume crops of semi-arid tropics using next generation sequencing and high-throughput genotyping technologies. Journal of Bioscience 37: 811-820.
- Varshney RK, Thudi M, Nayak SN, Gaur PM, Kashiwagi J (2014) Genetic dissection of drought tolerance in chickpea (*Cicer arietinum* L.) Theoretical and Applied Genetics 127: 445-461.
- Wang M, Jiang N, Jia T, Leach L, Cockram J, Waugh R, Ramsay L, Thomas B, Luo Z (2011) Genome-wide association mapping of agronomic and morphologic traits in highly structured populations of barley cultivars. Theoretical and Applied Genetics 124: 233-246.
- Yadav SS, Sandhu JS (2007) Area, production and distribution In: Yadav SS, Redden RJ Chen W eds. Chickpea breeding and management CABI International, pp 167-178.
- Yu J, Pressoir G, Briggs WH, Vroh BI, Yamasaki M, Doebley JF (2006) A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. National Genetics 38: 203-208.
- Zhang J, Hao C, Ren Q, Chang X, Liu G, Jing R (2011) Association mapping of dynamic developmental plant height in common wheat. Planta 234: 891-902.
- Zhang Q, Wu C, Ren F, Li Y, Zhang C (2012) Association analysis of important agronomical traits of maize inbred lines with SSRs. Australian Journal of Crop Science 6: 1131-1138.