Research Article

Nova Biologica Reperta 10(2): 143-157 (2023)

Print ISSN: 2423-6330/Online ISSN: 2476-7115

https://nbr.khu.ac.ir; Kharazmi University Press; DOI: 10.29252/nbr.10.2.143

مقاله پژوهشی

یافته‌های نوین در علوم زیستی

جلد ۱۰، شماره ۲، صفحات ۱۴۳ الی ۱۵۷ (۱۴۰۲)

انتشارات دانشگاه خوارزمی

ارزیابی تحمل یخ‌زدگی در ژنوتیپ‌های امیدبخش نخود با استفاده از صفات فیزیولوژیک و نشانگرهای مولکولی

المیرا شکوهی[۱]، امید سفالیان[۱]، علی اصغری[۱]، سعید خماری[۱]، بهروز اسماعیل پور[۲] و حامد افلاطونی[۱]

[۱] گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران؛ [۲] گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

مسئول مکاتبات: امید سفالیان، Sofalian@gmail.com

چکیده. نخود یکی از مهم‌ترین گیاهان تیره بقولات بوده و در جیره غذایی از اهمیت زیادی برخوردار است. به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی، آزمایشی با ۱۸ ژنوتیپ نخود در قالب طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی اجرا شد. پس از خوگیری گیاهان به سرما، تیمار یخ‌زدگی در دماهای ۶-، ۸- و ۱۰- اعمال شد و دمای ۵۰ درصد کشندگی (LT_{50}) آن‌ها با تبدیل پروبیت تعیین شد. قبل و بعد از مرحله خوگیری نمونه برگی برداشت و میزان محتوای نسبی آب برگ، رنگیزه‌های فتوسنتزی، پرولین، قند محلول، درصد پروتئین، کاتالاز، پراکسیداز، پلی‌فنول‌اکسیداز و شاخص سبزینگی اندازه‌گیری شد. نتایج تجزیه واریانس صفات فیزیولوژیکی نشان داد که تمامی صفات مورد بررسی به غیر از میزان کلروفیلa، کلروفیلb، و پلی فنول پراکسیداز، از نظر شرایط خوگیری در سطح ۱ درصد با یکدیگر تفاوت معنی‌دار داشتند. در صفات کلروفیلa، کلروفیلb، و پلی فنول پراکسیداز از نظر شرایط خوگیری در سطح ۵ درصد با یکدیگر تفاوت معنی‌دار داشتند. ارقام مورد بررسی از نظر صفات کلروفیلa، کلروفیل کل و شاخص سبزینگی دارای تفاوت معنی‌دار بودند. در اثر متقابل شرایط × رقم نیز از میان کلیه صفات مورد بررسی کاتالاز و شاخص سبزینگی با هم تفاوت معنی‌دار داشتند. ژنوتیپ ۵ با کمترین مقدار LT_{50} (۸/۸۶-) و بالاترین درصد زنده‌مانی (۸۰٪) مقاوم‌ترین و ژنوتیپ ۱۰ با بیشترین مقدار LT_{50} (۳/۵۷-) و کم‌ترین درصد زنده‌مانی به همراه ژنوتیپ ۱۵ حساس‌ترین ژنوتیپ‌ها به یخ‌زدگی شناخته شدند. به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی، DNA استخراج و با استفاده از ۲۱ آغازگر مختلف ISSR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل بیانگر وجود پلی‌مورفیسم (چند شکلی) در میان این ارقام بود. در مجموع ۱۰۱ نوار واضح تولید شد، که از این میان ۹۴ نوار چندشکل بودند. محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) در محدوده ۰/۳۳۲ (آغازگر ۷) تا ۰/۰۴۹ (آغازگر۱۶) بود. میزان تنوع ژنی بین ۰/۱۲۶ تا ۰/۹۷۷ متغیر بود. تجزیه و تحلیل کلاستر ژنوتیپ‌ها با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و به روش UPGMA انجام شد و ۱۸ ژنوتیپ گیاه نخود در ۳ گروه دسته‌بندی شدند.

واژه‌های کلیدی. بهاره‌سازی، تنوع ژنتیکی، خصوصیات فیزیولوژیکی، ISSR، LT_{50}

Evaluation of freezing tolerance in chickpea promising genotypes (*Cicer arietinum*) using physiological traits and molecular markers

Elmira Shokoohi[1], Omid Sofalian[1], Ali Asghari[1], Saeid Khomari[1], Behrooz Esmaielpour[2] & Hamed Aflatooni[1]

[1]Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran; [2]Department of Horticulture, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

Corresponding author: Omid Sofalioan, Sofalian@gmail.com

Abstract. Chickpea is one of the most important plants of the legume family and is very important in the diet. In order to investigate the genetic diversity of chickpea, an experiment was conducted with 18 chickpea genotypes in the form of a completely to investigate the genetic diversity of chickpea, an experiment was conducted with 18 chickpea genotypes in the form of a completely randomized block design. After acclimatization of plants to cold, freezing treatment was applied at temperatures of -6, -8 and -10 and their 50% lethality temperature (LT_{50}) was determined by probit transformation. Before and after the habituation stage, a leaf sample was taken and the relative content of leaf water, photosynthetic pigments, proline, soluble sugar, protein percentage, catalase, peroxidase, polyphenol oxidase and greenness index were measured. Genotype number 5 with the lowest LT_{50} (-8.86) and the highest survival percentage (80%) was the most resistant

Received 06.02.2023/ Revised 01.05.2023/ Accepted 10.05.2023/ Published 20.09.2023

دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۱۷/ اصلاح: ۱۴۰۲/۰۲/۱۱/ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۲/۲۰/ انتشار: ۱۴۰۲/۰۶/۲۹

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1402.10.2.5.0]

genotype and genotype 10 with the highest LT_{50} (-3.57) and the lowest survival percentage along with genotype 15 were recognized as the most sensitive genotypes. In order to evaluate genetic diversity, DNA extraction was utilized and 21 different ISSR primers were used in the investigation. The results showed the presence of polymorphism among the cultivars studied. A total of 101 clear bands were produced, of which 94 were polymorphic bands. Polymorphic information content (PIC) was in the range of 0.332 (initiator 7) to 0.049 (initiator 16). The amount of gene diversity was between 0.126 and 0.977 changes. Cluster analysis of genotypes was done using Jaccard similarity coefficient and UPGMA method and 18 genotypes of chickpea plants were classified into 3 groups.

Key words. genetic variation, ISSR, LT_{50}, physiological characteristics, vernalization

مقدمه

نخود (*Cicer arirtinum* L.) گیاهی یک‌ساله، خودگشن و دیپلوئید با تعداد کروموزوم ۱۶= ۲x= ۲n است که توسط همزیستی با باکتری ریزوبیوم سبب تثبیت نیتروژن اتمسفری می‌شود که از این طریق باعث کاهش معضلات ناشی از بیماری‌ها و تنش‌های زیستی و غیرزیستی در تناوب با غلات می‌گردد (Flores-Tinoco et al., 2020؛ Jangir et al., 2020). نخود دارای محتوای پروتئین، فیبر و چربی بالا و محتوای کربوهیدرات کمتر از گندم بوده و همچنین حاوی بسیاری از ترکیبات زیست فعال مانند اسید فنولیک و ایزوفلاون‌ها است (Rachwa-Rosiak et al., 2015). نخود منبع مهمی از اسیدهای چرب غیراشباع، عمدتاً اسید لینولئیک و اسید اولئیک است. ایزوفلاون‌ها و کاروتنوئیدها از ترکیبات زیست فعال در نخود هستند که دارای فواید بالقوه‌ای برای سلامتی مانند پیشگیری از بیماری‌های قلبی عروقی، کاهش کلسترول خون، فعالیت ضد دیابت، ضد سرطان و ضد التهاب است (Kaur & Prasad, 2021). نخود به‌دلیل فراهمی زیستی پروتئین بالا، ارزش بیولوژیکی و پروفایل اسید آمینه متعادل، منبع خوبی از پروتئین غذایی در نظر گرفته می‌شود(Jukanti et al., 2012). بازار مواد غذایی آینده بیشتر بر امنیت غذایی و نیاز به منابع پروتئینی پایدار متمرکز است. اکثر جمعیت‌ها در حال حاضر به سمت یک رژیم غذایی گیاهی سوق پیدا کرده‌اند، بنابراین تمرکز بر کاوش و گسترش منابع پروتئینی گیاهی است. نخود منبعی ارزان و غنی از پروتئین (۲۰ تا ۲۲ درصد) است (Grasso et al., 2022). بازده فعلی نخود برای پاسخگویی به تقاضای رو به رشد غذاهای گیاهی، به ویژه پروتئین گیاهی کافی نیست (Jha et al., 2022). برای رفع ای مشکل تلاش‌های جدی برای توسعه ارقام نخود پرمحصول با استفاده از روش‌های متداول اصلاحی صورت گرفته است. با این حال، موفقیت به دلیل تنوع ژنتیکی محدود ارقام نخود کشت شده که نتیجه اهلی‌سازی است، محدود شده است (Singh et al., 2021). در طول دهه گذشته، این تنوع ژنتیکی محدود، انگیزه استفاده از اقوام و نژادهای نخود وحشی را در برنامه‌های اصلاحی ایجاد کرده است. هدف از این تلاش‌ها گسترش پایه ژنتیکی نخود برای اصلاح گونه‌هایی با تحمل بیشتر به خشکی، سرما، گرما و بیماری‌ها است (Jha et al., 2022; Ghangal et al., 2020). این جنس از نخود دارای ۳۴ گونه چند ساله وحشی و ۹ گونه یک‌ساله است و گونه *Cicer arietinum* تنها گونه زراعی از میان ۹ گونه یکساله است (Singh et al., 2008). نخود به دلیل سازگاری گسترده آب و هوایی، هزینه کم تولید، استفاده در تناوب‌های گیاهی (مثلا در تناوب با غلات) و توانایی تثبیت نیتروژن اتمسفری، یکی از مهم‌ترین انواع حبوبات در سیستم کشاورزی پایدار به‌شمار می‌رود. این گیاه پس از نخود فرنگی (*pisum sativum* L.) و لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.) رتبه اول در جنوب آسیا و رتبه سوم جهانی را در بین حبوبات به خود اختصاص داده است. گیاه نخود (*Cicer arietinum* L.)، یکی از انواع حبوباتی است که در فصل سرما مورد کشت قرار می‌گیرد. با این حال، دوره‌های سرما و گرما تهدیدهای اصلی در تولید نخود است که باعث کاهش قابل توجه عملکرد به ویژه در مرحله گلدهی می‌شود (Zeitelhofer et al., 2022). دمای پایین یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیر زیستی و محیطی است، که می‌تواند خسارت شدید و گاها غیر قابل جبرانی را به بافت‌ها و سلول-های گیاهی وارد سازد. گیاهان برای مقاومت در برابر تنش‌هایی مانند یخزدگی در شرایط طبیعی رشد، دارای روش‌های سازگاری متعددی هستند که یک از مهم‌ترین آن‌ها فرآیند خوسرمایی است (Sanghera et al., 2011). در فرآیند خوسرمایی، با قرارگیری گیاه در دمای ۲ تا ۱۰ درجه - سانتی‌گراد، مکانسیم‌های سلولی و بین سلولی مؤثر در تحمل به شرایط یخزدگی، فعال می‌شوند. سازگاری با سرما عمدتاً با تنظیم بیان ژن و تغییرات متابولیک مشخص می‌شود که منجر به تغییرات مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی مختلف در گیاهان می‌شود (Baier et al., 2019). تحت تاثیر تنش سرمایی، عملکرد غشاءهای سلولی به عنوان اولین جایگاه خسارت تحت تأثیر قرار می‌گیرد (Barrero et al., 2017).

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1402.10.2.5.0]

یکی از عوامل مهم تحمل به سرما در گیاهان، تغییر خصوصیات غشای پلاسمایی سلول است. تحمل بیشتر سرما در برخی از ژنوتیپ‌ها ممکن است به دلیل پایداری خصوصیات فیزیکی و شیمیایی غشاء و فعالیت‌های اکسیداسیونی مرتبط باشد. با توجه به نتایج گزارشات، اندازه‌گیری و ارزیابی شاخص نشت الکترولیتی (ELI) حتی در مراحل ابتدایی تنش سرمایی می‌تواند الگوی مناسبی از میزان تحمل به سرما را نشان دهد (Nazari et al., 2012). دمایی که در آن ۵۰ درصد از بوته‌ها می‌میرند (LT_{50})، به وسیله آزمون‌های انجماد کنترل شده برآورد می‌شود و روش مناسبی برای محاسبه بقا و ارزیابی تحمل به سرما به شمار می‌رود. برای محاسبه LT_{50} باید از چندین دمای مختلف استفاده شود و استفاده از یک دما نمی‌تواند نتایج قابل اعتمادی را تولید کند (Dunne et al., 2019). در بررسی‌های انجام شده بر روی گیاهانی به غیر از نخود (مانند گندم)، بین LT_{50} و درصد بقا در مزرعه همبستگی قوی گزارش شده است (Bergjord Olsen et al., 2018). مطالعه تنوع پاسخ‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه به تنش یخ‌زدگی، پیش‌نیاز فرآیند اصلاحی برای تحمل بیشتر در دمای پایین است. نتایج تغییرات ژنتیکی را در میان ژنوتیپ‌ها در پاسخ به تنش یخ‌زدگی نشان داد که می‌تواند برای برنامه‌های اصلاحی گیاهان برای غربال‌گری و معرفی ژنوتیپ‌های مقاوم به سرما برای کشت پاییزه، به‌ویژه در مناطق سردسیر مفید باشد (Rapacz et al., 2015). در یک پژوهش به منظور بررسی تأثیر دماهای پایین بر تحمل انجماد نخود با استفاده از کشت آزمایشگاهی، نتایج نشان داد که اثر دماهای مختلف انجماد بر میزان بقا و درصد آسیب معنی‌دار بود است. با کاهش دما، درصد بقا کاهش یافت، در حالی که درصد آسیب افزایش یافت، اما بین سه ژنوتیپ مورد بررسی تفاوت معنی‌دار وجود نداشت. این مطالعه نشان می‌دهد که غربالگری آزمایشگاهی ژنوتیپ‌های نخود برای تحمل سرما رضایت‌بخش است و به دلیل تکرارپذیری بالا می‌توان آن را با گزینش در مزرعه جایگزین کرد (Keykha et al., 2012). همچنین در بررسی به‌عمل آمده از یک ژنوتیپ حساس و دو ژنوتیپ متحمل به سرما در نخود مشاهده گردید، که LT_{50} ژنوتیپ‌های متحمل به سرما کمتر نسبت به ژنوتیپ حساس به سرما بود و خوسرمایی منجر به افزایش درصد بقای ژنوتیپ-های مورد آزمایش شد (Nezami et al., 2007). نشانگرهای مولکولی، میزان چند شکلی را در سطح DNA مشخص کرده و تحت تأثیر شرایط محیطی (مانند تنش سرمایی) یا مراحل رشدی گیاه قرار نمی‌گیرند (Amiteye, 2021). اهمیت کاربرد این نشانگرها در کشاورزی، به‌خصوص در مطالعات مربوط به تنوع ژنتیکی و نقشه‌یابی ژن برای دستیابی به یک یا مجموعه‌ای از ژن‌ها با عملکرد خاص ثابت شده است (Roorkiwal et al., 2017). نشانگرهای مولکولی قطعات خاصی از DNA هستند که در کل ژنوم قابل شناسایی هستند. نشانگرهای مولکولی در مکان های خاصی از ژنوم یافت می شوند. نشانگرهای مولکولی کاربردهای مختلفی از قبیل: کلون‌سازی مبتنی بر نقشه ژنی، گزینش به کمک نشانگر، ارزیابی سطوح تنوع ژنتیکی درون ژرم پلاسم، نشاندار کردن ژن‌های مفید از نظر اقتصادی، ترسیم نقشه‌های پیوستگی ژنتیکی، بررسی روابط خویشاوندی بین ژرم‌پلاسم و تجزیه نقشه‌های مقایسه‌ای و بررسی تغییرات ژنتیکی در اثر تنش‌ها دارند (Soriano, 2020). نشانگرهای مولکولی را بر اساس روش ایجاد آن‌ها به سه دسته: نشانگرهای مبتنی بر دورگ‌گیری، نشانگرهای مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و نشانگرهای مبتنی بر توالی‌یابی DNA (Grover & Sharma, 2013) تقسیم می‌کنند. برخی از نشانگرهای مبتنی بر PCR شامل RAPD، ISSR، AFLP، SSRs و ریز ماهواره‌ها هستند (Amiteye, 2021). تکنیک ISSR نسبت به RAPD قابل اعتمادتر بوده و تعداد چندشکلی بیشتری را در هر آغازگر ایجاد می‌کند (Zangeneh & Salehi, 2019). این تکنیک تنها به مقدار کمی از DNA الگو نیاز دارد و برای ساخت پرایمر به اطلاعات توالی ژنوم نیاز ندارد. نشانگرهای ISSR همچنین توزیع تصادفی را در سرتاسر ژنوم ارائه می دهند که منجر به تولید چندین قطعه در هر واکنش می‌شود (Shi et al., 2010). نشانگرهای مولکولی و به واسطه آن‌ها نقشه‌های پیوستگی ژنتیکی برای درک فعالیت‌های مولکولی و به‌نژادی ضروری هستند. از نشانگرهای مولکولی در بررسی گونه زراعی نخود استفاده بسیار کمی شده است، که این امر ممکن است به‌دلیل تنوع ژنتیکی کم این گونه در خزانه‌های کشت شده باشد. نقشه‌برداری ژنتیکی در نخود به دلیل چندشکلی اندک برای مدت طولانی با مشکل مواجه بوده است، اما امروزه، توسط نشانگرهای مبتنی بر ریزماهواره‌های با درصد چندشکلی بالا و هم غالب تسهیل می‌شود (Roorkiwal et al., 2017). با این حال، در نتیجه از بین رفتن زیستگاه های طبیعی به دلیل تغییرات شدید آب و هوایی، گونه های وحشی *Cicer arirtinum* به سرعت در حال تبدیل شدن به گونه های در معرض خطر هستند. بنابراین، حفظ عملکرد نخود به یک وظیفه چالش برانگیز برای اصلاح کنندگاه تبدیل شده

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1402.10.2.5.0]

است و نقش حیاتی در توسعه انعطاف‌پذیری آب و هوایی در نخود دارند (Chandora et al., 2020).

مواد و روش‌ها

مکان و مواد گیاهی

پژوهش حاضر در گلخانه‌ای با موقعیت جغرافیایی ۳۸.۲۵ شمالی و ۴۸.۳۰ شرقی در ارتفاع ۱۵۰۰ متری از سطح دریا و در دانشگاه محقق اردبیلی انجام شد. در این آزمایش هجده ژنوتیپ نخود از بانک ژن گیاهی موسسه تحقیقات کشاورزی دیم شهرستان گچساران دریافت و از نظر تحمل تنش یخزدگی مورد ارزیابی قرار گرفتند. نامگذاری هجده ژنوتیپ به دلیل لاین بودن با شماره انجام گرفته است تا پس از طی مراحل آزمایش، بهترین لاین‌ها برای تجاری‌سازی معرفی شوند. تعداد ۵ بذر در گلدان‌های پلاستیکی به قطر ۱۰ سانتی‌متر و در عمق ۲ تا ۳ سانتی‌متری از سطح خاک مورد کشت قرار داده شدند. گلدان‌ها حاوی کود حیوانی، خاک زراعی و ماسه شسته شده، هر یک به نسبت یک سوم بودند. به‌منظور ایجاد خوسرمایی، گلدان‌ها به اتاقک سرما با قابلیت برنامه‌ریزی منتقل و دمای اتاقک روی ۴ درجه‌سانتی‌گراد تنظیم شد. دوره نوری به مدت ۱۱ ساعت روشنایی و توسط طریق یک لامپ فلورسنت ۱۰۰ وات و به‌دنبال آن ۱۳ ساعت تاریکی در اتاقک سرما اعمال شد. فرآینده اعمال خوسرمایی به مدت ۳ هفته به‌طول انجامید. که در این مدت آبیاری گیاهان در مواقع مورد نیاز انجام شد. تیمارهای سرمایی شامل خوسرمایی شده و عدم خوسرمایی بودند. برای این منظور آبیاری گلدان‌ها ۲۴ ساعت قبل از اعمال تیمار یخزدگی انجام شد. به منظور جلوگیری از پدیده فرا سرما در دمای ۳- درجه سانتی‌گراد و در نتیجه آن ایجاد کریستال‌های یخ در گیاهچه و اطمینان از این‌که ساز و کار از نوع تحمل است نه اجتناب، دما به‌مدت ۱۲ ساعت ثابت نگه داشته شد و پس از آن دما با سرعت ۲ درجه سانتی‌گراد در ساعت کاهش یافت. این امر شرایط را برای توزیع مجدد آب در بافت‌های گیاهی و جلوگیری از تشکیل کریستال‌های یخ در بافت‌های گیاهی و در نتیجه آن یخزدگی داخل سلول‌ها که در طبیعت به‌ندرت اتفاق می‌افتد، فراهم می‌کند (Ding et al., 2019). در این آزمایش سه تیمار درجه حرارت ۶-، ۸- و ۱۰- درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. برای برقراری تعادل در دمای محیط، در هر تیمار دمایی مورد نظر گیاهان به‌مدت یک ساعت نگه داشته شدند. به منظور کاهش سرعت ذوب، دمای اتاقک سرما به مدت ۲۴ ساعت در ۴ درجه سانتی‌گراد تنظیم و نگه‌داری شد. سپس به منظور بررسی درصد بقای گیاهان، گلدان‌ها به گلخانه منتقل و پس از ۲۱ روز بازیابی مورد ارزیابی قرار گرفتند (Homer et al., 2016).

ارزیابی مورفوفیزیولوژیکی

بعد از اعمال خوسرمایی برخی صفات فیزیولوژیکی مانند میزان شاخص سبزینگی با استفاده از دستگاه کلروفیل‌متر مدل SPAD-502 از جوان‌ترین برگ کامل، اندازه‌گیری رنگیزه‌های فتوسنتزی براساس روش Lichtenthaler (1987)، محتوای نسبی آب برگ به روش Ritchie و Nguyen (1990)، پرولین با استفاده از روش Bates و همکاران (1973)، اندازه‌گیری قند محلول به روش Irygone و همکاران (1992)، کل محتوای پروتئینی از جوان‌ترین برگ‌ها و با بهره‌گیری از روش Bradford (1976)، فعالیت سینتیکی آنزیم کاتالاز با استفاده از روش Chance و Mahlie (1955) اندازه‌گیری فعالیت کمی پراکسیداز و فعالیت آنزیم پلی-فنول اکسیداز با روش Kar و Mishra (1976) با یکسری تغییرات انجام گردید. پس از اعمال تیمارهای یخزدگی با استفاده از تجزیه پروبیت دمای کشنده برای ۵۰ درصد نمونه‌ها (LT50) با روش Gusta و همکاران (1982)، در مقابل دمای یخزدگی مشخص شد. سپس سایر گیاهان از گلدان‌ها به شرایط طبیعی منتقل شده و پس از ۲۱ روز درصد بقاء و بازیافت گیاهان مورد بررسی قرار گرفت. درصد بقای گیاهان از طریق شمارش تعداد بوته‌های زنده در هر گلدان و توسط فرمول زیر محاسبه شد (Cardona et al., 1997):

{۱۰۰× (تعداد گیاهان زنده پیش از تیمار یخزدگی/ تعداد گیاهان زنده ۳ هفته بعد از تیمار یخزدگی)}=درصد زنده‌مانی گیاهان

قبل از انجام تجزیه واریانس، آزمون نرمال بودن داده‌ها به روش کولموگروف و اسمیرنوف برای تمام صفات انجام شد. تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای SAS و SPSS 23 و مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون دانکن و در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت. استفاده از نرم‌افزار SAS به دلیل سرعت بالای پردازش اطلاعات نسبت به سایر نرم‌افزارها بوده و برای تجزیه و تحلیل داده‌ها و تحلیل‌های پیشرفته آماری مورد استفاده قرار می‌گیرد. نرم‌افزار SPSS نیز برای به‌دست آوردن خلاصه آماری، گراف‌ها، جدول‌ها، توزیع‌های گسسته و پیوسته مورد استفاده قرار می‌گیرد.

ارزیابی مولکولی

به منظور بررسی‌های مولکولی ابتدا از برگ‌های جوان گیاه نمونه‌برداری انجام و سپس نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل شدند. استخراج DNA به روش CTAB همراه با تغییرات جزئی طبق روش Saghai-maroof و همکاران (Saghai-maroof et al., 1984) انجام شد. از دو روش برای تعیین کیفیت و کمیت

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1402.10.2.5.0]

DNA استفاده شد. پس از استخراج DNA، برای اطمینان از عدم وجود شکستگی، از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد. برای این منظور نمونه‌های دارای کیفیت بالا انتخاب شدند. همچنین در روش دیگری از اسپکتروفتومتر UV-Visible مدل ۷۳۱۵ (ساخت شرکت Jenway انگلستان) برای تعیین کیفیت خلوص DNAهای استخراج شده، استفاده شد. توالی آغازگرهای مورد استفاده در تجزیه (ساخت شرکت Metabion کره) در جدول ۱ آمده است. از بین آغازگرهای مورد استفاده، تعداد ۲۱ آغازگر نوارهای چند شکل ایجاد کردند که با علامت (*) مشخص شده‌اند. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) برای آغازگرهای ISSR طبق برنامه‌ای مشخص در زیر، توسط دستگاه ترموسایکلر (ساخت شرکت TECHNE) اجرا گردید. چرخه‌های دمایی واکنش PCR به صورت زیر بود: در مرحله اول، فرآیند واسرشته سازی اولیه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و مرحله دوم شامل ۴۰ چرخه (الف: واسرشته‌سازی به مدت ۱ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد. ب: اتصال آغازگرها به رشته‌های الگو به مدت ۱ دقیقه در دمای بهینه برای هر آغازگر. ج: بسط رشته DNA توسط پلی‌مراز به مدت ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد) و در مرحله سوم، گسترش دادن نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. سپس از الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد و رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید برای آشکارسازی فرآورده‌های واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز حاصل از تجزیه ISSR استفاده شد.

نتایج و بحث

تجزیه و تحلیل درصد زنده‌مانی و LT_{50}: نتایج به‌دست آمده از بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی نشان داد که، بالاترین میزان LT_{50} (۸/۸۶-) مربوط به ژنوتیپ شماره ۵ بود که درصد زنده‌مانی بالایی (۸۰٪) داشت. همچنین ژنوتیپ شماره ۱۰ با کم‌ترین میزان LT_{50} (۳/۵۷-) دارای درصد زنده‌مانی پایینی (۱۰٪) بود. طبق نتایج به‌دست آمده ژنوتیپ شماره ۵ با بالا-ترین میزان LT_{50} (۸/۸۶-) و بالاترین درصد زنده‌مانی به‌عنوان مقاوم‌ترین ژنوتیپ و ژنوتیپ شماره ۱۰ با کم‌ترین میزان LT_{50} (۳/۵۷-) و کم‌ترین درصد زنده‌مانی به‌همراه ژنوتیپ ۱۵ به‌عنوان حساس‌ترین ژنوتیپ‌ها به یخ‌زدگی شناخته شدند. بر اساس نتایج به‌دست آمده درصد زنده‌مانی از ۱۶ تا ۵۴ درصد در تیمار دمایی ۶- و ۰/۲۲ تا ۸۰ درصد در تیمار دمایی ۸- و ۱۰ تا ۱۹ درصد در تیمار دمایی ۱۰- متغیر بود (جدول ۲).

جدول۱- توالی و دمای اتصال آغازگرهای ISSR مورد استفاده.

Table 1. Sequence and annealing temperature of used ISSR primers.

Number	Primers Sequence	Temperature	Number	Primers Sequence	Temperature
1*	GAG AGA GAG AGA GAG	42	13*	AGA GAG AGA GAG AGA GT	43
2*	ACA CAC ACA CAC ACA CCA	45	14	CTC TCT CTC TCT CTC TA	42
3*	AGA GAG AGA GAG AGA GAA	45	*15	CAC ACA CAC ACA CAC AT	43
4*	AGA GAG AGA GAG AGA GCC	45	16*	TCT CTC TCT CTC TCT CC	42
5*	AGA GAG AGA GAG AGA GC	42	17*	ACA CAC ACA CAC ACA CT	43
6*	AGA GAG AGA GAG AGA GG	42	18*	AGA GAG AGA GAG AGA GCT	43
7*	GAG AGA GAG AGA GAG AA	42	19*	AGA GAG AGA GAG AGA GCC	43
8*	AGA GAG AGA GAG AGA CT	42	20*	GAG AGA GAG AGA GAG ACC	43
9*	AGA GAG AGA GAG AGA CTA	43	21*	CAC ACA CAC ACA CAC AAC	44
*10	GAG AGA GAG AGA GAG ATT	43	22	CTC CTC CTC CTC CTC CTC	46
11*	TGT GTG TGT GTG TGT GGG	46	23*	GGA GAG GAG AGG AGA	42
*12	TCC TCC TCC TCC TCC	42			

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1402.10.2.5.0]

ژنوتیپ‌های شماره ۴ و ۵ بیشترین درصد زنده‌مانی را نشان دادند. می‌توان بیان داشت که درصد بقای نخود با افزایش شدت تنش یخزدگی روندی نزولی دارد. به‌طوری که بیشترین درصد بقاء با متوسط ۸۰ درصد از تیمار دمایی ۸- درجه سانتی‌گراد و کم‌ترین درصد بقاء با متوسط ۱۰ درصد از تیمار دمایی ۱۰- درجه سانتی‌گراد به‌دست آمد. در بررسی LT_{50} در بقای طولانی مدت گندم زمستانه مشخص شد که بالا بودن LT_{50}، بطور قابل توجهی از طریق مکانیسم تحمل توانایی زنده ماندن در شرایط یخزدگی را افزایش می‌دهد که نشان دهنده وجود هم‌پوشانی در نتایج به‌دست آمده است (Skinner & Garland-Campbell, 2008).

نتایج به‌دست آمده از تجزیه واریانس LT_{50} (میانگین زمان مرگ‌ومیر) نشان داد که بین ژنوتیپ‌ها در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌داری وجود دارد. که نشان دهنده وجود تنوع ژنتیکی در بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی از نظر این صفت بوده و با نتایج به‌دست آمده از مقالات دیگر در این زمینه همخوانی دارد. با توجه به واکنش متفاوت ژنوتیپ‌ها از نظر LT_{50} می‌توان اینگونه نتیجه گرفت که LT_{50} یک صفت مناسب برای ارزیابی مقاومت به یخزدگی است (Bergjord Olsen et al., 2018). نتایج حاصل از مقایسه میانگین به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد در جدول (۳) آورده شده است. بر اساس نتایج به‌دست آمده در ارتباط با صفت LT_{50} کم‌ترین میزان LT_{50} در ژنوتیپ شماره ۵ (۲/۸۰۸-) و بالاترین میزان LT_{50} در ژنوتیپ شماره ۴ (۷/۰۹-) مشاهده شد. ژنوتیپ‌های ۱، ۲، ۳، ۷، ۸، ۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۶، ۱۷ و ۱۸در یک خوشه قرار گرفتند. بنابراین از نظر صفت LT_{50}، هیچ اختلاف معنی‌داری بین ژنوتیپ‌ها وجود ندارد.

تجزیه صفات فیزیولوژیکی

بر اساس نتایج تجزیه واریانس، تمامی صفات مورد بررسی به غیر از میزان کلروفیلa، کلروفیلb، و پلی فنول پراکسیداز، از نظر شرایط خوگیری در سطح ۱ درصد با یکدیگر تفاوت معنی‌دار داشتند. در صفات کلروفیلa، کلروفیلb، و پلی فنول پراکسیداز از نظر شرایط خوگیری در سطح ۵ درصد با یکدیگر تفاوت معنی‌دار داشتند. ارقام مورد بررسی از نظر صفات کلروفیلa، کلروفیل کل و شاخص سبزینگی دارای تفاوت معنی‌دار بودند. در اثر متقابل شرایط × رقم نیز از میان کلیه صفات مورد بررسی کاتالاز و شاخص سبزینگی با هم تفاوت معنی‌دار داشتند. بیشترین میزان ضریب تغییرات مربوط به صفت پراکسیداز یعنی ۶۶/۲ و کم‌ترین مقدار مربوط به میزان صفت شاخص سبزینگی، ۶/۷ است. در کل، مقادیر ضریب تغییرات صفات حاکی از آن بود که صفات فنولوژیک دارای ضریب تغییرات پایین‌تری نسبت به صفات مورفولوژیک هستند. وراثت‌پذیری عمومی نیز از ۳۳۳/۲ در صفت کلروفیل a تا صفر در صفت پروتئین متغییر بود. در مجموع می‌توان از صفاتی که وراثت‌پذیری بالایی دارند، در جهت بهبود و اصلاح نخودهای زراعی استفاده کرد. معنی‌دار شدن و وجود اختلاف معنی‌دار در بررسی اثر متقابل ژنوتیپ در شرایط خوسرمایی نشان می‌دهد که روند تغییرات ژنوتیپ‌ها از نظر صفات در شرایط عادی و شرایط خوسرمایی ثابت نبوده و ارقام برتر در شرایط عادی لزوما قابل توصیه برای کشت در شرایط تنش یخزدگی و محیط‌های سرد نیست. در رابطه با صفت کاتالاز، با اعمال شرایط خوسرمایی میزان صفت کاهش یافته است. کاهش آنزیم کاتالاز در شرایط خوسرمایی به علت این است که کاتالاز آنتی‌اکسیدانتی است که با تبدیل پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن موجب حذف و غیر فعال شدن گونه‌های اکسیژن می‌شود البته افزایش کاتالاز چشمگیر نبود. رقم ۱۶(نام رقم ۹) بیشترین میزان صفت را در هر دو سطح به خود اختصاص داد. رقم ۸ دارای کم‌ترین میزان کاتالاز در سطح شاهد بود ولی میزان افزایش آن در شرایط خوسرمایی نسبت به سایر ارقام بیشتر بود که نشان‌دهنده مقاومت این رقم نسبت به تنش یخزدگی است. صفت شاخص سبزینگی در شرایط خوسرمایی با کاهش همراه بود. بیشترین و کم‌ترین میزان صفت در سطح شاهد به ترتیب به ژنوتیپ‌های ۲ و ۶ (نام رقم) تعلق داشت. نتایج مقایسه میانگین شرایط به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد نشان داد که صفت آب نسبی برگ (RWC) تحت تأثیر شرایط خوسرمایی قرار گرفته و میزان آن افزایش دارد این در حالیست که این افزایش چشمگیر نبود.

برای هر دو سطح تیماری با توجه به تمامی صفات اندازه‌گیری شده جهت بررسی و گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها، تجزیه خوشه‌ای به روش وارد و با استفاده از معیار فاصله اقلیدسی بر اساس میانگین استاندارد شده صفات فیزیولوژیک انجام شد. دندروگرام به‌دست آمده از تجزیه خوشه‌ای، ارقام را بر اساس صفات ارزیابی شده در شرایط شاهد و خوسرمایی شده به ۳ و ۲ گروه مختلف تقسیم کرد (شکل ۱). در سطح شاهد گروه اول شامل ژنوتیپ‌های ۱۵، ۱۷، ۶، ۸، ۱۸، ۷، ۱ و۱۲، گروه دوم شامل ژنوتیپ‌های شماره ۲، ۱۰، ۳، ۱۳، ۱۱ و ۱۴ و ژنوتیپ‌های ۹، ۱۶، ۵ و ۴ در گروه سوم جای گرفتند. در شرایط خوسرمایی ژنوتیپ‌ها به ۲ گروه تفکیک شدند که گروه اول شامل ژنوتیپ‌های ۹، ۱۷، ۱۵، ۱۱، ۱۳، ۲، ۸، ۱۸، ۱۲، ۵، ۷ و ۱۴ بودند. و گروه دوم را ژنوتیپ‌های شماره ۳، ۱۶، ۱۰، ۱، ۴ و ۶ در بر گرفت. این تقسیم بندی نشان دهنده وجود تنوع مطلوب در بین نمونه‌ها است که می‌توان از آن در

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1402.10.2.5.0]

برنامه‌های اصلاحی و به‌نژادی استفاده کرد. ژنوتیپ‌های دارای فاصله‌ی ژنتیکی زیاد، مناسب برای دو رگ‌گیری و دستیابی به هیبریدهای با هتروزیس بالا هستند. با توجه به فاصله بین گروه-ها به ویژه گروه اول و آخر و نمونه‌های موجود در هر گروه، می-توان والدین مناسبی را جهت هیبریداسیون مستقیم و غیر مستقیم انتخاب کرد. نتایج تجزیه تابع تشخیص نشان داد که تمام ژنوتیپ‌های موجود در هر دو دندروگرام ترسیم شده بر اساس صفات فیزیولوژیکی (سطح شاهد و شرایط خوسرمایی)، به درستی گروه‌بندی شده‌اند. به عبارتی جایگاه برش برای تعیین تعداد گروه در هر دو دندروگرام به درستی انجام شده است. برای تعیین گروه‌های بهتر در هر سطح میانگین هر گروه برای صفات مورد بررسی آورده شد. در سطح شاهد ژنوتیپ‌ها به سه گروه تفکیک شدند که با توجه به میانگین هر گروه در صفات، گروه سوم با چهار ژنوتیپ به عنوان گروه و ژنوتیپ‌های برتر شناخته شدند. در شرایط خوسرمایی شده ژنوتیپ‌های مورد بررسی به دو گروه تفکیک شدند که گروه اول به دلیل داشتن میانگین بالا در اکثر صفات به عنوان گروه برتر شناخته شد. با این‌حال میان دو گروه سطح خوسرمایی شده تفاوت زیادی وجود نداشت. با توجه به نتایج ژنوتیپ‌های شماره ۵ و ۹ در تمامی گروه‌بندی‌ها در گروه برتر قرار گرفتند که نشان‌دهنده‌ی پایداری عملکرد در شرایط تنش غیرزیتی است. بنابراین به‌عنوان ژنوتیپ‌های متحمل انتخاب شدند.

تجزیه مولکولی ISSR

در این بررسی به منظور تشخیص و ارزیابی تنوع بین ژنوتیپ‌های گیاه نخود از آغازگر مولکولی ISSR استفاده شد که از بین ۲۳ آغازگر اولیه پس از غربالگری، ۲۱ آغازگر الگوی نواری مناسب و قابل امتیازدهی تولید کردند. در مجموع از بین ۱۰۱ نوار قابل امتیازدهی، ۹۴ نوار چند شکل در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه تولید شدند (جدول ۴)، که نشان از تنوع بین ژنوتیپ‌ها و توانایی خوب آغازگرهای ISSR در تفکیک ژنوتیپ‌ها بود. نمونه‌ای از الگوی نواربندی آغازگر شماره ۲۱ در شکل ۲ ارائه شده است. بیشترین باند تولیدی مربوط به آغازگر شماره ۲۱ با ۹ باند و کم‌ترین تعداد متعلق به نشانگرهای شماره ۱ با ۳ باند بود. بیشترین تعداد باند چند شکل مربوط به آغازگر شماره ۲۱ با ۹ باند و کم‌ترین درصد چندشکلی مربوط به آغازگر شماره ۱۶ به میزان صفر درصد بود. به عبارتی به جز پرایمرهای شماره ۱، ۱۶، ۱۷، ۱۸ و ۱۹ همه پرایمرها ۱۰۰ درصد پلی‌مورف بودند. میزان PIC برای ۲۱ آغازگر مورد استفاده در تجزیه ISSR بین ۰/۳۳۲ در آغازگر شماره ۷ تا ۰/۰۴۹ در آغازگر شماره ۱۶ متغیر بود. بنابراین آغازگر شماره ۷ با بیشترین مقدار PIC، بهتر از سایر آغازگرهای به کار رفته توانست تنوع ژنتیکی نمونه‌ها را مشخص کند. میزان اطلاعات چند شکلی (PIC) یکی از شاخص‌های مهم جهت تعیین قدرت تمایز آغازگرهای مولکولی است و به طور گسترده در مطالعات مربوط به بررسی تنوع ژنتیکی استفاده شده است (Velasco-Ramírez et al., 2014; Thudi et al., 2010). حداکثر PIC در حالتی است که فراوانی آللی مساوی و برابر ۰/۵ باشد و در این صورت PIC به حداکثر مقدار خود یعنی ۰/۵ می‌رسد. در مطالعات مختلف میزان PIC متفاوت بوده و نمی‌تواند عدد ثابتی داشته باشد. میزان PIC به عواملی مثل تعداد آلل در هر جایگاه، محتوای نوکلئوتیدی Tو G در نواحی تکرار شونده (که همبستگی مثبتی با محتوی چند شکلی دارد) و طول توالی تکراری وابسته است (Serrote et al., 2020). هم-چنین، تعداد ژنوتیپ و تعداد آغازگر نیز با محتوی اطلاعات چند شکلی همبستگی مثبت دارد (Prasad et al., 2000). شاخص آغازگری (MI) نیز که به عنوان یک معیار کارایی در تعیین چند شکلی استفاده می‌گردد، محاسبه شد. شاخص آغازگر (MI) از ۲/۰۹۹ برای آغازگر شماره ۲۱ و صفر برای آغازگر شماره ۱۶ متغیر بود. این شاخص پتانسیل هر آغازگر را در تولید نوار بیش-تر نشان می‌دهد (Powell et al., 1996). پرایمرهای دارای چندشکلی بالا، EMR بیشتری داشتند. این شاخص از ۹ برای آغازگر شماره ۲۱ تا صفر برای آغازگر شماره ۱۶ متغیر بود. برآورد شاخص RP از ۳/۷۷۷ برای آغازگر شماره ۳ تا صفر برای آغازگر شماره ۱۶ متغیر بود. سه آغازگر (۲۳، ۲۱ و ۳) که دارای مقادیر بالای RP (۲/۷۷۷، ۳/۶۶۶ و ۳/۷۷۷) بودند کارآمدترین نشانگرها برای تفکیک ژنوتیپ‌ها معرفی می‌شوند. یکی از مهم-ترین شاخص‌ها برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در بین ژنوتیپ‌ها و جمعیت‌ها، شاخص تنوع ژنی نی (Nei, 1972) است. برآورد شاخص نی نشان داد که میزان تنوع ژنی بین ۰/۲ تا ۰/۴۲ متغیر بود. ضریب شانون بیانگر میزان چند شکلی در بین ژنوتیپ‌هاست (Shannon, 1948). میانگین ضریب شانون ۰/۴۲ است که نشان‌دهنده تنوع متوسط در ژنوتیپ‌های مورد بررسی است. آغازگر شماره ۴ بیشترین شاخص شانون را نشان می‌دهد و آغازگر شماره ۱۶ کم‌ترین شاخص شانون را دارد (جدول ۵) .بیشترین تعداد آلل‌های مؤثر (Ne) در آغازگر شماره ۷ مشاهده شد. به منظور تعیین روابط ژنوتیپ‌های مورد مطالعه تجزیه خوشه‌ای کلی با حضور تمامی ژنوتیپ‌ها انجام شد. در این تجزیه از سه ضریب فاصله ژنتیکی مختلف (دایس، تطابق ساده و ژاکارد) و سه روش خوشه‌بندی مختلف (UPGMA, Single Linkage, Complete Linkage) استفاده شد.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1402.10.2.5.0]

جدول ۲- درصد زنده‌مانی و میانگین زمان مرگ‌ومیر (LT_{50}) ژنوتیپ‌های نخود در دماهای مختلف و تحت شرایط کنترل شده.

Table 2. Viability percentage and average lethality (LT_{50}) of Chickpea Genotypes at different temperatures and under controlled conditions.

Genotype number	Viability Rate %			LT_{50}
	-6°C	-8°C	-9°C	
1	45	25	15	-5.20
2	50	0/22	14	-5.49
3	54	36	13	-6.52
4	67	54	18	-7.09
5	58	80	17	-8.86
6	42	78	12	-4.62
7	51	70	19	-6.52
8	51	19	14	-6.03
9	17	22	15	-4/25
10	16	53	10	-3.57
11	33	76	14	-5.52
12	16	16	14	-5.04
13	19	27	16	-5.15
14	25	39	19	-3.64
15	16	40	11	-4.64
16	49	0	11	-5.80
17	41	6	14	-6.31
18	37	45	13	-6.41

جدول ۳- مقایسه میانگین LT_{50} برای ژنوتیپ‌های نخود مورد مطالعه.

Table 3. Comparison of the average LT_{50} for the studied Chickpea Genotypes.

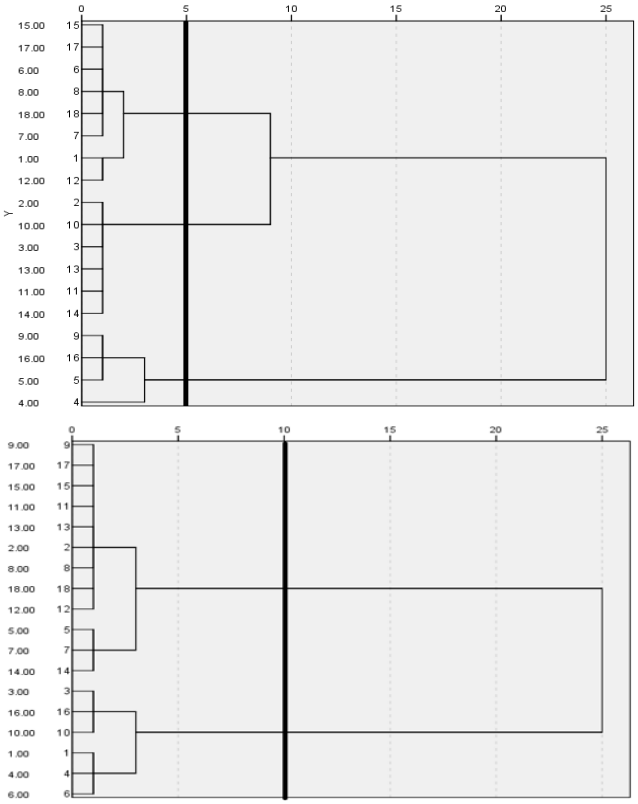
Genotype	LT_{50}
1	-5.756^{ab}
2	-5.498^{ab}
3	-6.504^{ab}
4	-7.090^{a}
5	-2.808^{b}
6	-4.628^{a}
7	-6.528^{ab}
8	-6.130^{ab}
9	-4.253^{a}
10	-3.570^{a}
11	-5.526^{ab}
12	-5.044^{ab}
13	-5.150^{ab}
14	-3.690^{a}
15	-4.649^{a}
16	-5.802^{ab}
17	-6.315^{ab}
18	-6.416^{ab}

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون فاقد اختلاف آماری در سطح پنج درصد هستند.

Averages with common letters in each column have no statistical difference at the five percent protection level.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1402.10.2.5.0]



شکل ۱- گروه‌بندی ژنوتیپ‌های نخود بر اساس صفات ارزیابی شده با روش WARD در شرایط پیش از خوسرمایی و پس از خوسرمایی (۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۶، ۱۷ و ۱۸).

Figure 1. Grouping of Chickpea Genotypes based on evaluated traits using the WARD method in pre-acclimation and post-acclimation conditions (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 and 18).

جدول ۴- پارامترهای تنوع ژنتیکی براساس نشانگرهای ISSR.

Table 4. Genetic variation parameters based on ISSR markers.

Primer number	Primer sequence	Total number of alleles observed	The number of effective alleles	Nei's genetic diversity (He)	Shannon index (I)
1	GAG AGA GAG AGA GAG	1.33	1.17	0.11	0.17
2	ACA CAC ACA CAC ACA CCA	2	1.36	0.22	0.36
3	AGA GAG AGA GAG AGA GAA	2	1.57	0.36	0.54
4	AGA GAG AGA GAG AGA GCC	2	1.79	0.41	0.58
5	AGA GAG AGA GAG AGA GC	2	1.33	0.2	0.33
6	AGA GAG AGA GAG AGA GG	2	1.60	0.34	0.51
7	GAG AGA GAG AGA GAG AA	2	1.78	0.42	0.61
8	AGA GAG AGA GAG AGA CT	2	1.38	0.24	0.39
9	AGA GAG AGA GAG AGA CTA	2	1.50	0.29	0.45
10	GAG AGA GAG AGA GAG ATT	2	1.57	0.33	0.50
11	TGT GTG TGT GTG TGT GGG	2	1.59	0.35	0.52
12	TCC TCC TCC TCC TCC	2	1.41	0.26	0.42
13	AGA GAG AGA GAG AGA GT	2	1.35	0.23	0.38
15	CAC ACA CAC ACA CAC AT	2	1.56	0.33	0.5
16	TCT CTC TCT CTC TCT CC	1	1	0	0
17	ACA CAC ACA CAC ACA CT	1.75	1.25	0.16	0.26
18	AGA GAG AGA GAG AGA GCT	1.83	1.41	0.26	0.40
19	AGA GAG AGA GAG AGA GCC	1.87	1.46	0.28	0.43
20	GAG AGA GAG AGA GAG ACC	2	1.19	0.15	0.29
21	CAC ACA CAC ACA CAC AAC	2	1.45	0.27	0.41
23	GGA GAG GAG AGG AGA	2	1.52	0.33	0.49
	Average	1.93	1.46	0.27	0.42

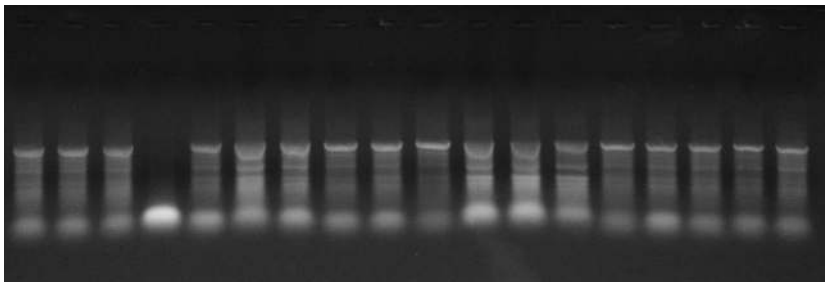
[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1402.10.2.5.0]

جدول۵- نشانگرهای ISSR مورد مطالعه و شاخص‌های به‌دست آمده.

Table 5. The studied ISSR markers and the obtained indicators.

Primer number	Primer sequence 5'_3'	Total number of band		Polymorphism percentage	PIC	MI	RP	MRP	EMR
1	GAG AGA GAG AGA GAG	3	1	33.3	0.0953	0.095	0.444	0.444	0.333
2	ACA CAC ACA CAC ACA CCA	7	7	100	0.1871	1.309	2.333	0.333	7
3	AGA GAG AGA GAG AGA GAA	3	3	100	0.2975	0.892	1.444	0.481	3
4	AGA GAG AGA GAG AGA GCC	5	5	100	0.3176	1.588	3.777	0.755	5
5	AGA GAG AGA GAG AGA GC	4	4	100	0.1683	0.673	1.333	0.333	4
6	AGA GAG AGA GAG AGA GG	4	4	100	0.2782	1.112	2.111	0.527	4
7	GAG AGA GAG AGA GAG AA	4	4	100	0.3329	1.331	2.888	0.722	4
8	AGA GAG AGA GAG AGA CT	4	4	100	0.2076	0.830	1.333	0.333	4
9	AGA GAG AGA GAG AGA CTA	5	5	100	0.2419	1.209	2.222	0.444	5
10	GAG AGA GAG AGA GAG ATT	4	4	100	0.2703	1.081	1.222	0.305	4
11	TGT GTG TGT GTG TGT GGG	5	5	100	0.2892	1.446	2.555	0.511	5
12	TCC TCC TCC TCC TCC	4	4	100	0.2273	0.909	1.444	0.361	4
13	AGA GAG AGA GAG AGA GT	4	4	100	0.2014	0.805	1.222	0.305	4
15	CAC ACA CAC ACA CAC AT	4	4	100	0.2695	1.078	2	0.5	4
16	TCT CTC TCT CTC TCT CC	2	0	0	0.0497	0	0	0	0
17	ACA CAC ACA CAC ACA CT	4	3	75	0.1361	0.408	0.888	0.296	2.25
18	AGA GAG AGA GAG AGA GCT	6	5	83.3	0.2168	1.084	2.111	0.422	4.166
19	AGA GAG AGA GAG AGA GCC	8	7	87.5	0.2319	1.623	3.222	0.460	6.125
20	GAG AGA GAG AGA GAG ACC	6	6	100	0.1489	0.893	1.111	0.185	6
21	CAC ACA CAC ACA CAC AAC	9	9	100	0.2333	2.099	3.666	0.407	9
23	GGA GAG GAG AGG AGA	6	6	100	0.2672	1.603	2.777	0.462	6
	Total	101	94						



شکل ۲- الگوی نواربندی آغازگر شماره18 در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه نخود.

Figure 2. Banding pattern of primer number 18 in studding Chickpea Genotypes.

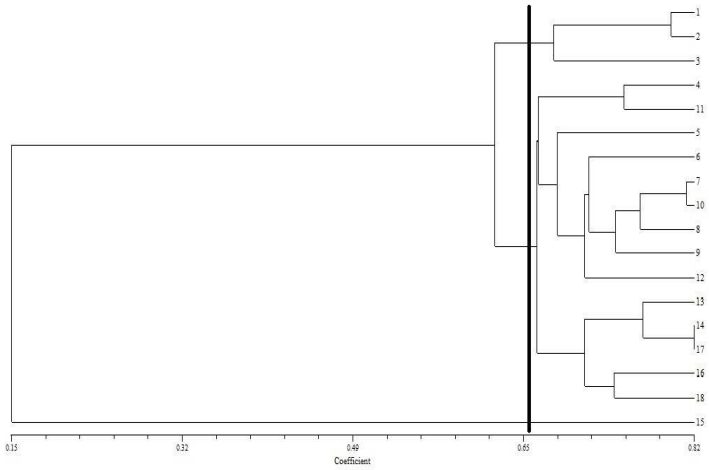
و بر اساس بالاترین ضریب همبستگی کوفنتیک، فاصله تشابه ژنتیکی ژاکارد و روش UPGMA انتخاب گردید. بر اساس نتایج به‌دست آمده از آزمون مانتل، ضریب همبستگی کوفنتیک (r =۰/۹۷) به‌دست آمد که نشان‌دهنده برازش خوب و همبستگی بالا بین ماتریس‌های تشابه و نمودار خوشه‌ای نهایی است. و در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار مشاهده گردید. در این تجزیه ۱۸ ژنوتیپ نخود مورد مطالعه به ۳ گروه تقسیم شدند. ژنوتیپ‌های شماره ۱، ۲ و۳ در گروه اول، ژنوتیپ‌های شماره ۴، ۱۱، ۵، ۴، ۷، ۱۰، ۸، ۹، ۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۷، ۱۶و ۱۸ در گروه دوم جای گرفتند و ژنوتیپ شماره ۱۵ به تنهایی در گروه سوم قرار گرفت (شکل ۳). با توجه به اینکه نشانگرهای ISSR نشانگرهای تصافی بوده و مناطق غیر رمزکننده نیز توسط

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1402.10.2.5.0]

آغازگرهای مورد استفاده تکثیر می‌شوند، بنابراین نباید انتظار داشت که همه ارقام مشابه از نظر صفات مورفوفیزیولوژیک در کنار هم قرار گیرند. البته تاثیر عوامل محیطی مانند تنش سرما و سرمایی را در بروز صفات ریخت شناسی نباید فراموش کرد. قرار نگرفتن ارقام دارای منشا مشترک در یک گروه ممکن است ناشی از پدیده جریان ژنی بین ارقام و دگرگشنی باشد (بیش از ۳۰ درصد دگرگشنی). به طور کلی، از تلاقی اجزای کلاسترهای مختلف می‌توان در برنامه‌های دورگ‌گیری به منظور تولید نتاج از والدین استفاده نمود.

تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCoA) به عنوان روش مکمل تجزیه خوشه‌ای برای گروه‌بندی و سپس بررسی روابط ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها انجام شد. سه مولفه اصلی اول ۵۱/۵۳٪ از تغییرات مولکولی بین ژنوتیپ‌ها را به خود اختصاص دادند (جدول ۶). مولفه اول ۲۹/۰۲٪ از تنوع کل را تبیین و مولفه‌های دوم و سوم به ترتیب ۱۲/۶۸٪ و ۹/۸۲٪ از تغییرات را تبیین کردند. پلات دو بعدی تجزیه به مؤلفه‌های اصلی که جهت گروه‌بندی و بررسی روابط بین ژنوتیپ‌ها رسم شد، ژنوتیپ‌ها را به ۳ گروه اصلی تفکیک نمود (شکل ۴). فاصله هندسی ایجاد شده بر روی پلات (نمودار) نشان دهنده فاصله ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها می‌باشد. هر چه بین ژنوتیپ‌ها فاصله بیشتری وجود داشته باشد، نشان دهنده وجود اختلاف بیشتر میان آن‌ها است. این گروه‌بندی با نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای (شکل ۳) مطابقت داشت.

به‌منظور بررسی ارتباط بین صفات اندازه‌گیری شده و نشانگرهای مولکولی، تجزیه رگرسیون برای بررسی ارتباط معنی‌داری به روش گام به‌گام انجام شد. بر اساس تجزیه رگرسیون صفات بررسی شده به عنوان متغیر تابع و داده‌های مولکولی (به‌صورت صفر و یک) به عنوان متغیر ثابت وارد مدل شدند (در صورت عدم مشاهده باند تکثیری صفر و در صورت وجود باند تکثیری یک قرار داده می‌شود). در این بررسی تمامی صفات مورفولوژیک با تعدادی نشانگر ISSR ارتباط معنی‌دار نشان دادند. کم‌ترین ضریب تبیین تصحیح شده، مربوط به صفت روز تا رسیدن دانه با مقدار ۰/۳۹۶ بود. صفت ارتفاع بوته با نشانگرهای m11l14 و m5l14 ارتباط مثبت داشت. صفت تعداد شاخه در بوته نیز با نشانگرهای m1l11، m1l3 و m17l4 دارای ارتباط مثبت و با نشانگرهای m12l1 و m2l2 دارای ارتباط منفی بود. صفت روز تا گلدهی با نشانگر m12l1 ارتباط مثبت و با نشانگر m19l7 ارتباط منفی داشت. صفت روز تا غلاف‌دهی با نشانگرهای m17l4 و m12l4 و صفت روز تا پر شدن غلاف با نشانگرهای m12l4 و m17l4 و صفت روز تا رسیدن دانه نیز با نشانگرهای m12l4 و m18l1 دارای ارتباط مثبت بودند. همچنین نشانگرهای m8l4، m17l4 و m21l7 دارای ارتباط مثبت و نشانگرهای m18l1 و m23l3 دارای ارتباط منفی با صفت وزن دانه بودند. با توجه به صفات وارد شده، نوارهایی که مقدار ضریب تبیین بالایی داشتند مورد بحث و بررسی قرار گرفتند. مقادیر ضرایب تبیین تصحیح شده نشان داد که، در مجموع ۱۰۱ نشانگر مثبت برای صفات فیزیولوژیک شناسایی شدند. تمام صفات مورد بررسی در هر دو سطح، ارتباط معنی‌داری را با تعدادی از نشانگرهای ISSR مورد مطالعه نشان دادند و برای تمام صفات، نشانگرهای مثبت شناسایی شد. مقادیر ضرایب تبیین تصحیح شده در سطح شاهد نشان داد که صفات پروتئین و پلی‌فنول‌اکسیداز به ترتیب با



شکل ۳- گروه‌بندی ژنوتیپ‌های نخود بر اساس داده‌های نشانگر ISSR با استفاده از ضریب تشابه ژاکارد و روش UPGMA.

Figure 3. Grouping of Chickpea Genotypes based on ISSR Marker data using Jaccard similarity coefficient and UPGMA method.

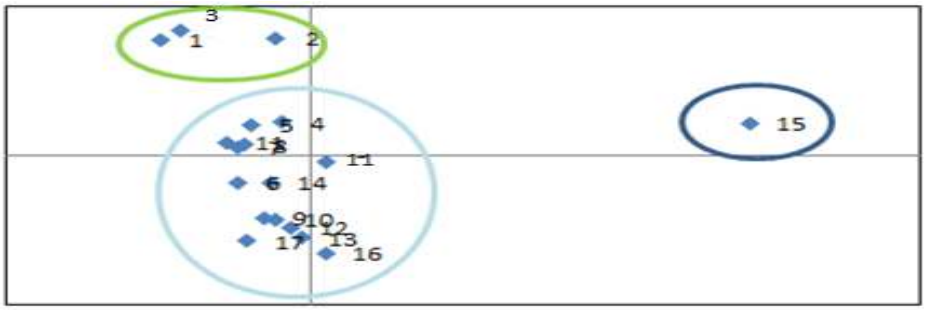
[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1402.10.2.5.0]

جدول ۶- تجزیه به مؤلفه‌های اصلی مربوط به نشانگر ISSR .

Table 6. Principal Component analysis related to ISSR marker.

	1	2	3
Relative Variation	29.02	12.68	9.82
Cumulative Variation	29.02	41.70	51.53



شکل ۴- نمودار دو بعدی پراکنش ژنوتیپ‌های نخود بر اساس دو مؤلفه‌های اصلی اول و دوم برای داده‌های مولکولی ISSR.

Figure 4. Two-dimensional diagram of the distribution of Chickpea Genotypes based on the first and second principal components for ISSR molecular data.

مقدار ۰/۹۹۹ و ۰/۹۹۸ دارای بیشترین و محتوای کلروفیل کل با مقدار ۰/۱۹۱ دارای کم‌ترین میزان تغییرات نشان داده شده توسط نشانگرها بودند. در سطح شاهد صفت قند محلول به دلیل عدم وجود رابطه علت و معلولی وارد مدل رگرسیونی نشد. در شرایط اعمال خوسرمایی، صفت پلی‌فنول‌اکسیداز با داشتن ضریب تبیین ۰/۹۹۱ بیشترین و صفت پراکسیداز با داشتن ضریب تبیین ۰/۳۵۲ کم‌ترین میزان تغییرات تبیین شده توسط نشانگرها را نشان دادند. در سطح اعمال خوسرمایی نیز صفت پرولین وارد مدل نشد. در سطح شاهد پلی‌فنول‌اکسیداز با ۱۰ نشانگر بیشترین و صفات کلروفیل a، کلروفیل کل، پراکسیداز و شاخص سبزینگی با یک نشانگر کم‌ترین تعداد نشانگر را به خود اختصاص دادند. در سطح شرایط اعمال خوسرمایی صفت پلی‌فنول‌اکسیداز با ۱۰ نشانگر بیشترین و صفات کلروفیل b و پراکسیداز با یک نشانگر کم‌ترین تعداد نشانگر را داشتند. برخی نشانگرها دارای رابطه معنی‌دار با بیش از یک صفت از صفات اجزای عملکرد بودند. همچنین با مقایسه هر دو سطح در برخی صفات نشانگرهای مشترکی مشاهده شد. در هر دو سطح مورد بررسی نشانگر m9l2 با صفت پروتئین دارای رابطه منفی بود. نشانگر m18l2 با صفت کاتالاز در سطح شاهد دارای رابطه مثبت و در سطح اعمال خوسرمایی دارای رابطه منفی بود. نشانگر m11l5 با صفت پلی‌فنول‌اکسیداز در سطح شاهد دارای رابطه مثبت و در سطح اعمال خوسرمایی دارای رابطه منفی بود. پلی‌فنول‌اکسیداز نیز با نشانگر m13l3 در سطح شاهد دارای رابطه مثبت و در شرایط اعمال خوسرمایی رابطه منفی داشت. در مجموع از بین ۲۱ آغازگر ISSR مورد بررسی، نشانگرهای m18l2 و m19l1 بیشترین تعداد مکان ژنی مرتبط با صفات مورد مطالعه را دارا بودند. QTL های دارای اثرات نسبی قوی، اهداف خوبی برای گزینش به کمک نشانگر، بخصوص برای صفاتی که اندازه‌گیری آن‌ها سخت است، هستند. یکی از دلایل احتمالی رابطه بین نشانگرهای مولکولی و نمود صفات کمی، عدم تعادل لینکاژی دخیل در روابط تصادفی مربوط به فراوانی‌های آللی همبسته در نمونه‌های کوچک است. لذا، پیوستگی ژنتیکی بین نشانگرها و مکان‌های ژنی مربوط به صفات کمی (QTLها) محتمل‌ترین توجیه برای این روابط است (Bink et al., 2012). امروزه استفاده از پیوستگی بین نشانگرهای مولکولی و ژن‌های کنترل کننده صفات کمی، فرآیند به‌نژادی گیاهان را سرعت بخشیده است. به‌طوری که به جای ارزیابی صفات، انتخاب غیرمستقیم می‌تواند به کمک نشانگرهای پیوسته انجام شود. شناسایی نواحی کروموزومی دخیل در تغییرات به دو روش عمده تجزیه پیوستگی و تجزیه ارتباط بین ژنوتیپ و فنوتیپ انجام می‌گردد (Paudel et al., 2020).

سپاسگزاری

بدینوسیله از حمایت‌های موسسه تحقیقات کشاورزی دیم شهرستان گچساران بابت در اختیار قرار دادن بذرهای لاین‌های امیدبخش نخود برای اجرای این تحقیق کمال تشکر و قدردانی را داریم.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1402.10.2.5.0]

REFERENCES

Amiteye, S. 2021. Basic concepts and methodologies of DNA marker systems in plant molecular breeding. Heliyon E08093, 2021. doi: 10.1016/j.heliyon. 2021.e08093.

Baier, M., Bittner, A. Prescher, A. & van-Buer, J. 2019. Preparing plants for improved cold tolerance by priming. Plant Cell Environ 42: 782–800. doi:10.1111/pce.13394.

Barrero S.C., Silvestre S. Haslam R.P., & Michaelson, L.V. 2017. Lipid remodelling: unravelling the response to cold stress in Arabidopsis and its extremophile relative Eutrema salsugineum. Plant Science 263: 194-200.

Bink, M.C.A.M., Totir, L.R. ter Braak, C.J.F. Winkler, C.R. Boer, M.P. & Smith, O.S. 2012. QTL linkage analysis of connected populations using ancestral marker and pedigree information. Theoretical and Applied Genetics 124: 1097-1113. doi.org/10.1007/s00122-011-1772-8.

Bates, L., Waldren, R. & Teare, I. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and Soil 39: 205-207.

Bergjord-Olsen, A.K., Persson, T. de Wit, A. Nkurunziza, L. Sindhøj, E. & Eckersten, H. 2018. Estimating winter survival of winter wheat by simulations of plant frost tolerance. Journal of Agronomy and Crop Science 204: 62-73. doi.org/10.1111/jac.12238.

Bradford, M.M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Dye Binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Chance, B., and Maehly, A.C. 1955. Assay of catalases and peroxidases. Methods in Enzymology 11: 764-755.

Cardona, C.A., Duncan, R.R. & Lindstorm, O. 1997. Low temperature tolerance assessment in paspalum. Crop Sciences 37: 1283-1291.

Chandora, R., Gayacharan, Shekhawat, N. & Malhotra, N. 2020. Chapter 3 - Chickpea genetic resources: collection, conservation, characterization, and maintenance. Chickpea: Crop Wild Relatives for Enhancing Genetic Gains 2020: 37-61. doi.org/10.1016/B978-0-12-818299-4.00003-8.

Chung, J., Babka, H.L. Graef, G.L. Staswick, P.E. Lee, D.J. Cregan, P.B. Shoemaker R.C. & Specht, J.E. 2003. The seed protein, oil, and yield QTL on soybean linkage group I. Crop Science 43: 1053-1067.

Ding, Y., Shi, Y. & Yang, S. 2019. Advances and challenges in uncovering cold tolerance regulatory mechanisms in plants. Plant Epigenetics 222: 1690-1704. doi.org/10.1111/nph.15696.

Dunne, J.C., Tuong, T.D. Livingston, D.P. Reynolds, W.C. & Milla-Lewis. S.R. 2019. Field and Laboratory Evaluation of Bermudagrass Germplasm for Cold Hardiness and Freezing Tolerance. Crop Science 59: 392-399. doi.org/10.2135/cropsci2017.11.0667.

Flores-Tinoco, C.E., Tschan, F. Fuhrer, Margot, C.T. Sauer, U. Christen, M. & Christen, B. 2020. Co-catabolism of arginine and succinate drives symbiotic nitrogen fixation. Molecular Systems Biology e9419. doi: 10.15252/msb.20199419

Ghangal, R., Rajkumar, M.S., Garg, R. & Jain, M. 2020. Genome-wide analysis of glutathione S-transferase gene family in chickpea suggests its role during seed development and abiotic stress. Molecular Systems Biology 47: 2749–2761. doi.org/10.1007/s11033-020-05377-8.

Grasso, N., Lynch, N.L. Arendt, E.K. & O'Mahony, J.A. 2022. Chickpea protein ingredients: A review of composition, functionality, and applications. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 21:435-452. doi:10.1111/1541-4337.12878.

Grover, A. & Sharma, P. C. 2013. Development and use of molecular markers: past and present. Critical Reviews in Biotechnology 36: 290-302. doi.org/10.3109/07388551.2014.959891.

Gusta, L.V., Fowler D.B. & Tyler, N.J. 1982. Factors influencing hardening and survival in winter wheat. n: P.H. Li and A. Sakai (Eds), Plant Cold Hardiness and Freezing and survival in winter wheat. In: P.H. Li and A. Sakai (Eds), Plant Cold Hardiness and Freezing Stress, Mechanisms and Cropa Implications. Academic Pressing 25: 23-40.

Homer, A., ŞAHİN, M. & Küçüközdemir, U. 2016. Evaluation of pea (*Pisum sativum* L.) germplasm for winter hardiness in Central Anatolia, Turkey, using field and controlled environment. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding 52:55-63. DOI: 10.17221/186/2015-CJGPB

Irigoyen, J.J., Emerich, D.W. & Sanchez-Diaz, M. 1992. Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in alfalfa (*Medicago sativa L.*). Plants and Plant Physiology 84: 55-60. doi.org/10.1111/j.1399-3054.1992.tb08764.x

Jangir, H., Bhardwaj, A. & Das, M. 2020. Larger root nodules increased Fe, Mo, Mg, P, Ca, Mn, K in the roots and higher yield in chickpea grown from nano FeS 2 pre-treated seeds: emulating nitrogenase. Applied Nanoscience 10: 445-454. doi: 10.1007/s13204-019-01238-4

Jha, U.C., Nayyar, H. Parida, S.K. Deshmukh, R. von-Wettberg, E.J.B. & Siddique, K.H.M. 2022. Ensuring Global Food Security by Improving Protein Content in Major Grain Legumes Using Breeding and 'Omics' Tools. International Journal of Molecular Sciences 23: 7710. doi.org/10.3390/ijms23147710

Jukanti, A. K., Gaur, P.M. Gowda, C.L.L. & Chibbar, R.N. 2012. Nutritional quality and health benefits of chickpea (*Cicer arietinum* L.). A review, British Journal of Nutrition 108: 11–26. doi.org/10.1017/S0007114512000797.

Kar, M. & Mishra, D. 1976. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. Plant Physiology 57: 315-319. doi: 10.1104/pp.57.2.315.

Kaur, R. & Prasad, K. 2021. Technological, processing and nutritional aspects of chickpea (*Cicer*

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1402.10.2.5.0]

arietinum) - A review. Trends in Food Science & Technology 109: 448-463. doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.044

Keykha Akhar, F., Bagheri, A. Moshtaghi, N. & Nezami, A. 2012. Selection for Freezing Tolerance in Chickpea (*Cicer arietinum* L.) by in vitro Culture. Iranian Journal of Field Crops Research 10: 292-298. doi.org/10.22067/GSC.V10I2.16162. (In Persion.)

Lichtenthaler, H.K., 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In Methods in enzymology Elsevier 148: 350-382. doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1.

Nazari, M.R., Maali Amiri, R. & Ramezanpour, S.S. 2011. Quantitative assessment of gene expression pattern of beta galactosidase and beta glucosidase under cold stress condition in chickpea. Modern Genetics Journal 4: 59-70. (In Persion.)

Nei, M., 1972. Genetic distance between populations. The American Naturalist 106: 283-292. doi.org/10.1086/282771

Nezami, A., Bagheri, A. Rahimian, H. Kafi, M. & Nassiri-Mahallati, M. 2007. Evaluation of feezing tolerance of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes under controlled conditions. Journal Of Science and Technology of Agriculture And Natural Resources 10: 257-269. dorl.net/dor/20.1001.1.24763594.1385.10.4.19.0. (In Persion).

Paudel, D., Dhakal, S. Parajuli, S. Adhikari, L. Peng, Z. Qian, Y. Shahi, D. Avci, M. Makaju, S.O. & Kannan, B. 2020. Use of quantitative trait loci to develop stress tolerance in plants. Plant Life Under Changing Environment. Responses and Management, 2020: 917-965. doi.org/10.1016/B978-0-12-818204-8.00048-5.

Prasad, M., Varshney, R., Roy, J., Balyan, H. & Gupta, P. 2000. The use of microsatellites for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity in wheat. Theoretical and Applied Genetics 100: 584-592. doi.org/10.1007/s001220050077.

Powell, W., Morgante, M. Andre, C. Hanafey, M. Vogel, J. Tingey S. & Rafalski, A. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Molecular Breeding 2: 225-238. doi.org/10.1007/BF00564200.

Rachwa-Rosiak, D., Nebesny, E. & Budryn, G. 2015. Chickpeas - Composition, Nutritional Value, Health Benefits, Application to Bread and Snacks: A Review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 55: 1137–1145. doi.org/10.1080/10408398.2012. 687418.

Rapacz, M., Sasal, M. & Wójcik-Jagła, M. 2015. Direct and indirect measurements of freezing tolerance: advantages and limitations. Acta Physiologiae Plantarum 37: 157. Doi.org/10.1007/s11738-015-1907-7.

Ritchie, S.W., Nguyen H.T. & Holaday, A.S. 1990. Leaf water content and gas-exchange parameters of two wheat genotypes differing in drought resistance. Crop Science 30: 105-111. doi.org/10.2135/cropsci1990.0011183X003000010025x.

Roorkiwal, M., Jain, A. Thudi, M. & Varshney, R.K. 2017. Advances in Chickpea Genomic Resources for Accelerating the Crop Improvement. The Chickpea Genome. Springer, Cham 53-67. DOI:10.1007/978-3-319-66117-9_6.

Saghai-Maroof, M.A., Soliman, K.M. Jorgensen, R.A. & Allard, R. 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. DOI: 10.1073/pnas.81.24.8014.

Sanghera, G.S., Wani, S.H. Hussain, W. & Singh, N.B. 2011. Engineering Cold Stress Tolerance in Crop Plants. Curr Genomics 12: 30–43. doi:10.2174/138920211794520178.

Serrote, C.M.L., Reiniger, L.R.S. Silva, K.B. Rabaiolli, S.M.D.S. & Stefanel, C.M. 2020. Determining the Polymorphism Information Content of a molecular marker. Gene 726: 144-175. doi.org/10.1016/j.gene.2019.144175.

Shannon, C. 1948. A Mathematical Theory of Communication, Bell System Technical Journal 27: 379-423 and 623-656. doi.org/10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x.

Shi, A., Kantartzi, S., Mmbaga, M. & Chen, P. 2010. Development of ISSR PCR markers for diversity study in dogwood (*Cornus* spp.) . Agriculture and Biology Journal of North America 1: 189 194. DOI: 10.5251/abjna.2010.1.3.189.194.

Singh, V. Chauhan, Y., Dalal, R. Schmidt, S. 2021. Chickpea. The Beans and the Peas. From Orphan to Mainstream Crops 2021: 173-215. doi.org/10.1016/B978-0-12-821450-3.00003-2.

Singh, R., Sharma, P., Varshney, R.K. Sharma S. & Singh, N.K. 2008. Chickpea improvement: role of wild species and genetic markers. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews 25: 267-313. doi: 10.5661/bger-25-267.

Skinner, D. & Garland-Campbell, K.A. 2008. The relationship of LT50 to prolonged freezing survival in winter wheat. Canadian Journal of Plant Science 2008: 88. doi.org/10.4141/CJPS08007.

Soriano, J.M. 2020. Molecular Marker Technology for Crop Improvement. *Agronomy 10*: 1462. doi.org/10.3390/agronomy10101462.

Thudi, M., Manthena, R. Wani, S.P. Tatikonda, L. Hoisington D.A. & Varshney, R.K. 2010. Analysis of genetic diversity in pongamia (*Pongamia pinnata* L.) using AFLP Markers. Journal of plant Biochemistry and Biotechnology 19: 209-216. doi.org/10.1007/BF03263342.

Velasco-Ramírez, A.P., Torres-Morán, M.I. Molina-Moret, S. Jesús Sánchez-González, J.D.J. & Santacruz-Ruvalcaba, F. 2014. Efficiency of RAPD, ISSR, AFLP and ISTR markers for the detection of polymorphisms and genetic

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1402.10.2.5.0]

relationships in camote de cerro (*Dioscorea* spp.). Electronic Journal of Biotechnology 17: 65-71. doi.org/10.1016/j.ejbt.2014.01.002.

Zangeneh, M. & Salehi, H. 2019. Sequence Repeat Polymorphism in *Narcissus* Accessions to Identify the Tolerant Genotypes for Deficit Irrigation. American Society for Horticultural Science 144: 92–106. doi.org/10.21273/JASHS04583-18.

Zeitelhofer, M., Zhou, R. & Ottosen, C.O. 2022. Physiological Responses of Chickpea Genotypes to Cold and Heat Stress in Flowering Stage. Agronomy 12*;* 2755. doi.org/10.3390/agronomy12112755.

*****

How to cite this article:

Shokoohi, E., Sofalian, O., Asghari, A., Khomari, S., Esmaielpour, B. & Aflatooni, H. 2023. Evaluation of freezing tolerance in chickpea promising genotypes (*Cicer arietinum* L.) using physiological traits and molecular markers. Nova Biologica Reperta 10: 143-157. (In Persian).

شکوهی، ا.، سفالیان، ا.، اصغری، ع.، خماری، س.، اسماعیل پور، ب. و افلاطونی، ح. ۱۴۰۲. ارزیابی تحمل یخزدگی در ژنوتیپ‌های امیدبخش نخود با استفاده از صفات فیزیولوژیک و نشانگرهای مولکولی. یافته‌های نوین در علوم زیستی ۱۰: ۱۵۷-۱۴۳.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1402.10.2.5.0]