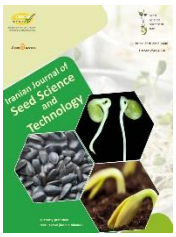
2025, 14 (3), 29-42 https://doi.org/10.22092/ijsst.2024.361695.1479

Seed Science Society of Iran

Seed and Plant Certification and Registration Institute

Iranian Journal of
Seed Science and Technology



ISSN: 2588-4638

*Research Article*

# Genetic Purity Assessment of Chickpea Seed Lots Using Phenotypic Characteristics and its Conformity with the Results of Genetic Fingerprinting

**Bita Oskouie[1*], Leila Sadeghi[2], Cobra Moslemkhani[3], Hadis Afshar[2], Zahra Radmanesh[2]**

1. Research Assistant Professor, Seed and Plant Certification and Registration Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.
2. Researcher, Seed and Plant Certification and Registration Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.
3. Research Associate Professor, Seed and Plant Certification and Registration Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

## Article Information

Received: 27 Dec. 2023
Revised: 10 Mar. 2024
Accepted: 11 Mar. 2024

**Keywords:**
Checkpea,
Fingerprinting,
Off-type,
Purity genetic

Corresponding Author:
b_oskouei@yahoo.com

## Abstract

Genetic purity, as one of the important characteristics of the quality of seed lots, has been considered in the national standards of certified seed producing countries to achieve desirable and stable characteristics of agricultural cultivars. According to the national standard, determining the other speciese in the seed sample is considered as one of the important tests of seed quality. This feature is checked with an emphasis on recognizable characteristics in the seed analysis laboratory. The research has investigated the characteristics and differences in appearance and genetics of seeds off- type of chickpea seeds. The results showed that the seeds that were considered as off- type morphologically differed from the control in at least one of the measured traits. These seeds were different from the original seed in terms of color, shape seed surface roughness and seed groove, also the selected indices were similar in the first and second generation seeds. The results of the molecular test also confirmed the results of the morphological investigations. In Adel, Mansour, Arman cultivars, the samples that in morphological studies were considered as off-type, in molecular studies using microsatellite markers H3F09, H3C11 and H1A06 showed that the molecular profile was not uniform and allele diversity was greater than the main allele of cultivars. In the process of seed certification program, microsatellite markers are a suitable and complementary tool to the use of morphological markers to determine the genetic purity of chickpea seed samples.

**How to cite this paper**: Oskouie, B., Sadeghi, L., Moslemkhani, K., Afshar, H., & Radmanesh, Z. (2025). Genetic purity assessment of chickpea seed lots using phenotypic characteristics and its conformity with the results of genetic fingerprinting. *Iranian Journal of Seed Science and Technology*, *14*(3), 29-42. https://doi.org/10.22092/ijsst.2024.361695.1479

© Authors, Published by Iranian Journal of Seed Science and Technology. This is an open-access article distributed under the CC BY (license https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

**EXTENDED ABSTRACT**

**Introduction**

Currently, chickpea seed production and certification in Iran is based on national standards and through the official seed production system. Achieving the desirable and stable characteristics of agricultural cultivars has a special place in the seed industry, so that the program of the Organization for Economic Cooperation and Development for the certification of cultivars in international trade provides methods and techniques to evaluate the quality of seeds during the stages of propagation and reproduction in order to ensure the stability of the identity and genetic purity of the cultivar.

**Materials and Methods**

Acording to ISTA Rules, one-kilogram samples of chickpea seeds from Adel, Mansour, Arman cultivars were taken from seven seed lots. The samples were examined based on the morphological characteristics listed in the UPOV guidelines and out-of-type seeds were separated in the seed samples. In the morphological assessment of seeds, some distinguishing traits such as color, shape, seed furrows and furrow depth were examined. In the plants obtained from distinct seeds (with different morphology from the known seeds of the variety), the date of flowering, flower color, date of pod formation, plant type, plant height, stem color and pod size were recorded compared to the control (plants obtained from pure seeds and typical of the variety). Sodium hydroxide and potassium hydroxide tests were considered as a chemical test to identify out-of-type seeds. Then out-of-type seeds were grouped based on the intensity of the reaction and the color created. SSR molecular method was used to verify the results.

**Results and Discussion**

The results of this research showed that some seeds in the seed samples harvested based on the instructions for differentiation, uniformity and stability in terms of color, shape and furrow depth were recognized as different from the original seed and were used as suspicious out-of-type seeds for further tests. The daughter seeds obtained from the plants of suspected out-of-type seeds were completely similar to their parents in terms of the studied characteristics, therefore, differentiated characteristics such as seed color, groove and seed shape are genetic characteristics and are not affected by environmental conditions. Chemical tests of sodium hydroxide and potassium hydroxide used to identify out-of-type seeds in this study showed different color spectrums in the seeds of different cultivars. The results of the molecular tests showed that the seeds that were considered as out-of-type chickpea seed according to the characteristics listed in the instructions for differentiation, uniformity and stability have different genetic characteristics and are in different genetic groups from the original seed (variety control sample).

**Conclusion**

Identifying and specifying the characteristics of cultivars is necessary for development programs, cultivar release and seed production. Maintaining the genetic purity of seeds is a fundamental condition for successful crop production, so that farmers can use the full potential of each seed only when they prepare seeds with high genetic purity. In addition to being influenced by the environment, the evaluation of morphological characteristics is time-consuming and requires the expenditure of land and labor. Therefore, the use of specific patterns of each variety with the help of DNA-based markers improves the efficiency of the activity.

دوره ۱۴، شماره ۳، صفحات ۴۲-۲۹ https://doi.org/10.22092/ijsst.2024.361695.1479

نشریه علوم و فناوری بذر ایران

ISSN: 2588-4638

مقاله پژوهشی

# ردیابی ناخالصی ژنتیکی ارقام نخود با استفاده از ویژگی‌های فنوتیپی و صحت‌سنجی آن به کمک انگشت نگاری ژنتیکی

بیتا اسکویی[1*]، لیلا صادقی[2]، کبری مسلم خانی[3]، حدیث افشار[2]، زهرا رادمنش[2]

۱. استادیار پژوهش، مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات،آموزش، و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

۲. پژوهشگر، مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی، کرج، ایران.

۳. دانشیار پژوهش، مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات،آموزش، و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

## چکیده

خلوص‌ژنتیکی به عنوان یکی از ویژگی‌های مهم کیفیت محموله‌های بذری، در استانداردهای ملی کشورهای تولیدکننده بذر برای دستیابی به خصوصیات مطلوب و پایدار ارقام زراعی مورد توجه واقع شده‌است. براساس استاندارد ملی بذر نخود، تعیین میزان سایر ارقام در نمونه بذری به عنوان یکی از آزمون‌های مهم کیفی بذر تلقی می‌شود که این ویژگی، با تأکید بر مشخصات ظاهری قابل تشخیص در آزمایشگاه بررسی می‌شود. تحقیق حاضر به برر سی ویژگی‌ها و تفاوت‌های ظاهری و ژنتیکی بذور خارج از تیپ بذرهای سه رقم نخود عادل، منصور، آرمان در هفت نمونه بذری پرداخته است. نتایج نشان داد بذرهایی که به عنوان خارج از تیپ در نظرگرفته شدند از نظر مورفولوژیکی حداقل در یکی از صفات اندازه‌گیری شده با شاهد اختلاف داشتند. این بذرها از نظر رنگ، شکل، میزان زبری سطح بذر و شیار روی بذر با بذر اصلی اختلاف داشتند و شاخص‌های منتخب در بذرهای نسل اول و دوم مشابه بود وتفاوت آنها با نمونه‌های بذر شاهد محرزگردید. نتایج آزمون مولکولی نیز مؤید نتایج بررسی‌های مورفولوژیک بود و نمونه‌هایی که از نظر مورفولوژیک در ارقام عادل، منصور، آرمان خارج از تیپ تشخیص داده شدند. نتایج آزمون مولکولی ارقام عادل، منصور و آرمان با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره H3F09، H3C11 و H1A06 نشان داد الگوی نواری مابین نمونه‌های شاهد و مشکوک یکنواخت نبوده و تنوع آللی نسبت به آلل غالب در ارقام شاهد و نمونه‌های مشکوک شناسایی شد. نتایج تحقیق حاضر مؤید این نکته است که نشانگرهای ریزماهواره به عنوان یک ابزار مناسب و تکمیلی در کنار صفات ظاهری در تعیین خلوص ژنتیکی نمونه‌های بذری نخود در برنامه گواهی بذر به ویژه زمانی که ابهاماتی در تمایز مورفولوژیکی بذر ارقام وجود دارد، نتایج قطعی ارائه خواهد داد.

## اطلاعات مقاله

**تاریخ دریافت:** ۱۴۰۲/۱۰/۰۶

**تاریخ بازنگری:** ۱۴۰۲/۱۲/۲۰

**تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۲/۱۲/۲۱

**واژه‌های کلیدی:**
انگشت‌نگاری ژنتیکی،
خارج از تیپ،
خلوص ژنتیکی،
نخود

**نویسنده مسئول:**
b_oskouei@yahoo.com

**نحوه استناد به این مقاله:**

Oskouie, B., Sadeghi, L., Moslemkhani, K., Afshar, H., & Radmanesh, Z. (2025). Genetic purity assessment of chickpea seed lots using phenotypic characteristics and its conformity with the results of genetic fingerprinting. *Iranian Journal of Seed Science and Technology*, 14 (3), 29-42. https://doi.org/10.22092/ijsst.2024.361695.1479

**مقدمه**

نخود[1] یک گیاه زراعی و منبع مهم کربوهیدرات و پروتئین در سبد غذایی مردم دنیا به‌ویژه آسیا و آفریقا محسوب می شود (Jukanti et al., 2012; Upadhyaya et al., 2008). در حال حاضر تولید و گواهی بذر نخود در کشور ایران براساس استانداردهای ملی و از طریق سیستم رسمی تولید بذر انجام می‌شود. دستیابی به خصوصیات مطلوب و پایدار ارقام زراعی از جایگاه ویژه‌ای در صنعت بذر برخوردار است بطوری‌که برنامه سازمان همکاری‌های اقتصادی و توسعه[2] برای گواهی بذر ارقام در تجارت بین‌المللی روش‌ها و فنونی را برای ارزیابی کیفیت بذر در طول مراحل تکثیر و ازدیاد فراهم نموده است تا از پایداری اصالت و خلوص ژنتیکی رقم اطمینان حاصل نماید (OECD, 2012). طی مراحل مختلف رشدی در مزارع در قالب دستوالعمل‌های اختصاصی هر گیاه، صفات ویژه‌ای برای تمایز و شناسایی یک رقم از سایر ارقام و همچنین تعیین خلوص ژنتیکی محموله‌های بذری در سیستم رسمی تولید بذر بکار می‌رود (Macha, 2010; Katagi et al., 2014, Button, 2006). رقم گیاهی توسط صفاتی تعریف می‌شود که نتیجه تجلی و بیان ژنوتیپ معینی بوده و حداقل در یک صفت بیان شده، از سایر ارقام گیاهی متمایز باشد (UPOV, 1991). در حال حاضر شناسایی و توصیف ارقام براساس نشانگرهای مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی در گونه‌های گیاهی انجام می‌گیرد (Smýkal et al., 2008). برای معرفی یک رقم نه تنها دانش و فنون پیشرفته بلکه هزینه‌های زیادی در سال‌های متمادی مصرف می شود. دستورالعمل‌های فنی خاص برای معرفی هر گونه و رقم گیاهی با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیک مشخص شده است اما عواملی نظیر اثر متقابل بین ژنوتیپ‌ها و محیط، هزینه‌بر و زمان‌بر بودن ارزیابی‌ها سبب محدودیت‌هایی در بهره‌برداری کامل روش‌های مذکور شده است (Cooke, 1995). محدودیت صفات مورفولوژیکی و تغییرات اندک در تظاهر بسیاری از این صفات، تمایز ارقام جدید را با چالش مواجه کرده است. شناسایی ارقام با استفاده از نشانگرهای مولکولی به دلیل مزیت‌های آن مورد توجه کمیته فنی اتحادیه بین المللی حمایت از ارقام جدید گیاهی قرار گرفته است. از مزایای مهم نشانگرهای مولکولی می‌توان به فراوانی بالا، بیان مستقل از شرایط محیطی، چند شکلی بالا، عدم وابستگی به مراحل رشد، امکان ارزیابی در هر مرحله از رشد و فراوانی ژنومی و توزیع تصادفی در ژنوم اشاره نمود (De Riek et al., 2001; Kwon et al., 2005; Singh et al., 2011; Winter et al., 2000). بدین ترتیب، بهره‌گیری از نشانگرهای مولکولی، به منظور حفظ کارایی آزمون‌های موفولوژیکی و نیز تکمیل نتایج حاصل از نشانگرهای مورفولوژیک ضروری است (Lombard et al., 2000). مابین نشانگر های مبتنی بر PCR، ریز ماهواره ها[3] یا توالی های تکراری ساده[4] به دلیل داشتن مزایایی چون تنوع آللی زیاد، چند شکلی بسیار بالا و همبارز بودن، به یک روش مناسب جهت تجزیه و تحلیل‌های ژنتیکی تبدیل شده است (Liu, 1996). در کارگروه روش های بیوشیمیایی و مولکولی[5] اتحادیه بین‌المللی حمایت از ارقام جدید گیاهی[6] نشانگرهای ریزماهواره به‌عنوان روش نشانگری مناسبی که در سطح وسیع می‌توان از آن برای شناسایی رقم استفاده نمود، معرفی شده است (UPOV, 2010). توالی‌های تکرار شونده، ارقام مختلف را متمایز کرده و تنوع ژنتیکی گونه‌ها را ارزیابی می‌کنند و در شناسایی ارقام گواهی شده نیز بکار می روند(Scarano et al., 2015).

در کلکسیون مرکزی نخود در آمریکا تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت ۳۷۶ توده نخود با استفاده از نشانگرهای SSR بررسی و ۳۸۸ آلل در بین توده‌های نخود شناسایی شد (Varshni et al., 2008). تنوع ژنتیکی ۴۸ ژنوتیپ ارقام نخود با استفاده از سه نشانگر مولکولی SSR، کدون های آغاز هدف یا SCoT[7] و چندشکلی نواحی حفاظت شده یا CDDP[8] نشان داد محتوی پلی‌مورفیسمی هر سه نشانگر نسبتاً مشابه است. با این وجود

[1] *Cicer arietinum* L.
[2] Organization for Economic Co-operation and Development, OECD
[3] Microsatelites,Simple Sequence Repeats
[4] Simple Sequence Repeats
[5] Biochemical and Molecular Techniques, BMT
[6] International Union for the Protection of New Varieties of Plants, UPOV
[7] Start Codon Targeted, SCoT
[8] Conserved DNA-derived Polymorphism, CDDP

براساس تجزیه خوشه‌ای، به کمک دو نشانگر SSR و SCoT ژنوتیپ‌های نخود ژنوتیپ‌ها به سه گروه و براساس نشانگر CDDP به پنج گروه طبقه بندی شدند (Hajibarat et al., 2015). در بررسی تنوع ژنتیکی۴۴ ژنوتیپ نخود ایرانی و خارجی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره، ۱۰۰ آلل شناسایی شد که براساس تعداد آلل در هر مکان، تعداد آلل مؤثر و شاخص تثبیت، تنوع ژنتیکی قابل توجهی بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی مشاهده شد (Saeed et al., 2011). طبق ا ستاندارد ملی ایران، جدا سازی بذر سایر ارقام در نمونه‌های بذری بر اساس مشخصات ظاهری قابل تمایز، انجام می‌شود (Anonymous, 2019). طی بررسی نمونه های بذری نخود در برخی ارقام، صفات متمایز کننده‌ای مشاهده شده که ضرورت دارد مشخص شود؛ آیا ظهور این صفات ناشی از شرایط محیطی است یا اینکه به‌عنوان یک مشخصه ژنتیکی می توان از آنها به عنوان شاخصی برای تمایز ارقام در آزمون‌های تجزیه کیفی بذر ا ستفاده نمود. تحقیق حا ضر به ارز یابی مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و ژنتیکی برخی از این صفات در ارقام رایج نخود در ایران پرداخته است.

## مواد و روش‌ها

### مواد گیاهی

نمونه‌های یک کیلوگرمی بذر نخود، از ارقام عادل، منصور، آرمان طبق دستورالعمل ISTA به صورت استاندارد از هفت محموله بذری برداشت شدند. نمونه ها براساس صفات مورفولوژیک مندرج در دستورالعمل UPOV بررسی و بذور خارج از تیپ در نمونه‌های بذری جدا شدند. پس از تصویربرداری، بررسی های دقیق مورفولوژیکی، شیمیایی و مولکولی برای تمایز بذرهای خارج از تیپ در مقایسه با نمونه خالص رقم انجام شد و بذرهای نسل بعد حاصل از بذرهای منتخب، به عنوان خارج از تیپ نیز مورد ارزیابی قرار گرفت.

### آزمون‌های مورفولوژیکی و شیمیایی

در ارزیابی مورفولوژیک بذرها برخی صفات متمایزکننده نظیر نظیر رنگ، شکل، شیارهای بذر و عمق شیار مورد بررسی قرار گرفت. در بوته های حاصل از بذور متمایز (با مورفولوژی متفاوت از بذر شناخته شده رقم)، تاریخ گلدهی، رنگ گل، تاریخ تشکیل غلاف، تیپ بوته، ارتفاع بوته، رنگ ساقه و سایز غلاف در مقایسه با شاهد (گیاهان حا صل از بذر خالص و تیپیک رقم) یادداشت‌برداری شد. دو آزمون هیدروکسید سدیم و هیدروکسید پتاسیم طبق روش ارائه شده (Lalita, 2007) به عنوان آزمون شیمیایی در شناسایی بذور خارج از تیپ در نظر گرفته شد و براساس شدت واکنش و رنگ ایجاد شده گروهبندی بذور خارج از تیپ انجام شد. مطابق این روش، ارقام نخود با استفاده از هیدروکسیدپتاسیم پنج درصد، به پنج گروه و با روش هیدروکسید پتاسیم دو درصد به سه طبقه رنگی مختلف تقسیم می‌شوند.

### آزمون مولکولی SSR

تک بذرهای خارج از تیپ در میکروتیوب‌های دو میلی‌لیتری توسط دستگاه تیشولایزر به مدت ۳ دقیقه با سرعت ۳۰ دور در دقیقه بصورت پودر شدند و مطابق روش سقایی معروف محتوی ژنتیکی از بافت پودر شده استخراج گردید( Saghai-Maroof et al., 1984). کیفیت و غلظت DNA به‌ترتیب با استفاده از ژل آگارز ۰/۸ درصد و بررسی نسبت جذب A260/A280 و A260/A230 با استفاده از دستگاه نانودراپ (مدل ND-1000) بررسی شد. غلظت نمونه‌های DNA با آب دیونیزه استریل در غلظت ۲۵ نانوگرم در میکرولیتر تنظیم شد. برای نگهداری طولانی نمونه‌های DNA در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

از مجموعه ۲۳۳ نشانگر معرفی شده برای نخود توسط لیچنزویگ و همکاران (Lichtenzveig et al., 2005)، نه نشانگر ریزماهواره با در نظر گرفتن جایگاه کروموزومی و بیشترین مقدار چندشکلی بین ارقام نخود انتخاب شد. اطلاعات مربوط به نه نشانگر مورد استفاده در تحقیق حاضر در جدول یک آورده شده است.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در حجم ۱۵ میکرولیتر با Master Mix آماده (شرکت سیناژن) با غلظت دو برابر[1] به میزان ۷/۵ میکرولیتر، ۰/۱۶ پیکومول از هر کدام از آغازگر های

[1] 2X

پیشرو و پسرو و ۲ میکرولیتر DNA الگو به غلظت ۵۰ نانوگرم استفاده شد. به منظور بهینه نمودن دمای اتصال هر جفت آغازگر ابتدا از یک شیب دمایی (گرادیان) زیر دمای ذوب[1] آغازگرها استفاده شد.

برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از دستگاه ترمو سایکلر ساخت شرکت Eppendorf مدل Master cycler Gradient استفاده گردید. چرخه‌های حرارتی برای تکثیر با آغازگرهای مورد استفاده شامل مرحله واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳ دقیقه، ۳۰ چرخه شامل واسرشته سازی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای بهینه شده هر کدام از آغازگرها (مطابق جدول ۱) به مدت ۳۰ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سلسیوس درجه به مدت ۳۰ ثانیه، سپس یک مرحله گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس درجه به مدت ۵ دقیقه بود. محصول PCR بر روی ژل پلی‌اکریل آمید ۱۰ درصد با دستگاه الکتروفورز عمودی مدل (MGV-202-33, C.B.S Scientific, USA) بارگذاری شد. زمان الکتروفورز به مدت دو ساعت و نیم با ولتاژ ۱۵۰ تنظیم گردید و سپس با محلول رنگ آمیزی ژل رد[2] به مدت ۲۰ دقیقه رنگ آمیزی شد. محصولات PCR پس از رنگ‌آمیزی، به کمک دستگاه ژل داک مشاهده و ثبت گردید.

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای استفاده شده (Lichtenzveig et al., 2005)

Table 1- Specifications of the used primers

| نشانگر<br>Marker | توالی (5'-3')<br>Sequence (5'-3') | اندازه قطعه<br>Fragment size (bp) | جایگاه<br>Locus | دمای اتصال<br>Annealing temperature |
|---|---|---|---|---|
| H1A06 | F: TGGATAATTGTAGGGTAAGAAATGC<br>R: TGTGTAATTTAAGTGTGGGGGTATT | 181 | (TAA)23 | 58 |
| H1A19 | F: AGTGGAACCCACCAAATTTTA<br>R: AACGAAACCCTTATATTTCTTCTCT | 149 | (TTA)4 | 57 |
| H1B11 | F: GCAGCTGTTGACATCTAATTTTG<br>R: ACCGAAAACACTTGTGATTGTTA | 203 | (TAA)20 | 59 |
| H3A12 | F: AACCTTAGACTGTGTTCGCTGA<br>R: TCAATCTTTTGTTGTTACTATGAATCTG | 179 | (GA)11 | 59 |
| H3C11 | F: GCCCATATTCAATTCTTACCATTATTA<br>R: ACCTTTAACGCTAATAGAGTGAGTTTA | 205 | (TTA)40 | 58 |
| H3F09 | F: AGCATGTAGTAGGAGGCAAGTATG<br>R: GTAGGTTCCCGCTACATTACTTTTA | 241 | (TTA)44 | 60 |
| H4B06 | F: CCATTAATACCGTCATCTCAGG<br>R:TGTGTTGTTGTATGACTAATGATAGTG | 148 | (GAT)4 | 60 |
| H6B12 | F: TTTCTCACCTCGTTGGTATATGA<br>R:CGTTTGATTGATGATAGTGATGC | 183 | (ATC)4 | 58 |
| H4A09 | F: ATTACAGAGCAAATGACCCTCA<br>R:TAATACTCCTCCCATTCCCAAA | 203 | (TC)10 | 57 |

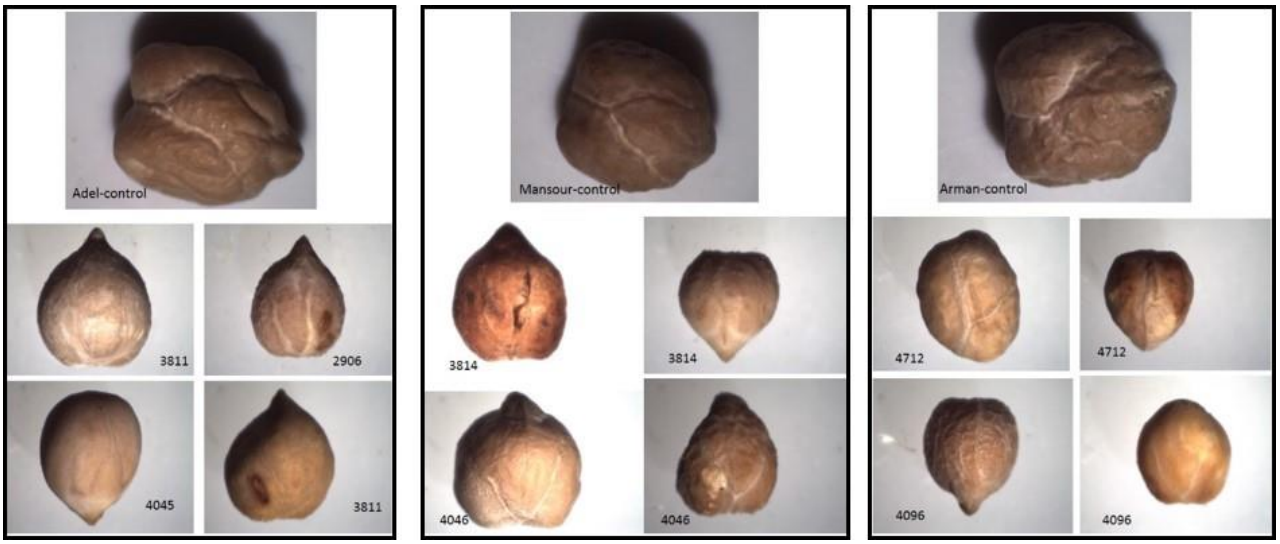
## نتایج و بحث

نتایج این تحقیق نشان داد، برخی بذرها در نمونه های بذری برداشت شده بر اساس دستورالعمل تمایز، یکنواختی و پایداری از نظر رنگ، شکل و عمق شیار متفاوت از بذر اصلی تشخیص داده شدند و به عنوان بذر مشکوک خارج از تیپ برای آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گرفتند (شکل ۱)، پس از کشت و بررسی‌های مورفولوژیکی و فنولوژیکی، بوته آنها حداقل در یکی از صفات رنگ گل، تاریخ گلدهی و تاریخ غلاف دهی با بوته حاصل از بذر شاهد رقم اختلاف نشان داد (جدول ۲).

بذرهای دختری حاصل از بوته‌های بذرهای مشکوک به

[1] Tmprerature melting, Tm
[2] Gel Red, Biotum

خارج از تیپ از نظر خصوصیات مورد بررسی شباهت کامل با والد خود داشتند بنابراین ویژگی‌هایی متمایز شده نظیر رنگ بذر، شیار و شکل بذر از خصوصیات ژنتیکی بوده و متاثر از شرایط محیط نمی‌باشد. دو آزمون شیمیایی هیدروکسید سدیم و هیدروکسید پتاسیم به کار رفته برای شناسایی بذر خارج تیپ در این مطالعه، نشان دهنده طیف رنگ متفاوت در بذرهای ارقام مختلف بودند. در اغلب موارد اختلاف رنگ کاملا واضح و در مواردی تشخیص این تفاوت در رنگ بذر نیاز به دقت و مهارت بیشتر داشت. از آنجا که ترکیبات تشکیل دهنده بذرها بین ارقام متفاوت است. واکنش این ترکیبات با مواد شیمیایی منجر به واکنش متفاوتی خواهد شد (Vishwanath et al., 2013). نتایج نشان داد براساس واکنش رنگی بذرها به هیدروکسید سدیم (NaOH)، نمونه‌های مورد آزمایش در چهار گروه رنگی در دامنه تغییرات رنگ محلول‌ها از بدون تغییر رنگ، زرد روشن، زرد تیره و عسلی طبقه‌بندی شدند.




شکل۱- اختلاف ظاهری بذرهای خارج از تیپ در مقایسه با بذر شاهد در سه رقم عادل، منصور و آرمان

Figure 1- The difference in morphology of off-type seeds compared to the control seed in three cultivars Adel, Mansour and Arman

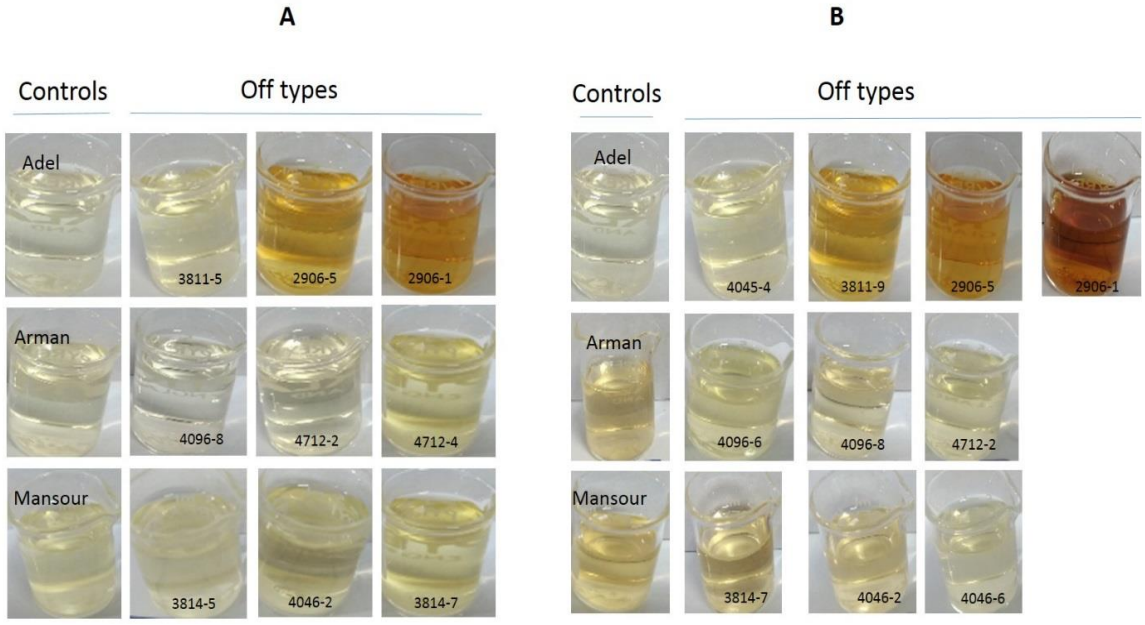
براساس آزمایش هیدروکسید پتاسیم (KOH)، تغییرات رنگ محلول‌های حاصل شامل بدون تغییر رنگ، زرد روشن، زرد تیره، عسلی و تقریبا قرمز بودند (شکل ۲). در هر دو روش شیمیایی اختلاف رنگ محلول بذرهای خارج تیپ و شاهد مشاهده شد. در محلول NaOH حداکثر دامنه تغییرات رنگی پنج طبقه و در KOH در چهار طبقه مشاهده شد. محققین دلیل تفاوت رنگ محلول در مجاورت محلول NaOH و KOH را اختلاف در ترکیبات بذر در ارقام مختلف و واکنش متفاوت ترکیبات موجود در بذر در مجاورت محلول دانسته‌اند (Mc Donald Jr, 1985; Nethra et al., 2007; Papp et al., 1997; Patil et al., 2006; Punia et al., 2002; Vanangamudi et al., 1998).

در آزمون مولکولی با نشانگرهای ریزماهواره، سه آغازگر H1A06، H3C11 و H3F09 از نه آغازگر مورد بررسی قادر به

نتایج آزمون‌های مولکولی که به منظور تکمیل نتایج مورفولوژیکی و شیمیایی انجام شد، نشان داد بذرهایی که مطابق خصوصیات مندرج دستورالعمل تمایز، یکنواختی و پایداری بذر نخود خارج تیپ در نظر گرفته شدند دارای خصوصیات ژنتیکی متفاوتی بوده و در گروهای مختلف ژنتیکی از بذر اصلی (نمونه شاهد رقم) قرار دارند. بذور شاهد ارقام عادل، آرمان و منصور الگوهای تکثیری متفاوتی داشتند. نمونه‌های مشکوک درمقایسه با نمونه‌های شاهد ارقام منصور، عادل و آرمان پروفایل مولکولی یکنواختی نداشتند و آلل‌هایی غیر از آلل غالب شاهد، در این نمونه‌ها مشاهده گردید. نشانگر H1A06 دو آلل متفاوت در

منصور تکثیر نمود که آلل سایر ارقام در بین نمونه‌های شاهد قابل شناسایی بود و در نمونه‌های مشکوک به منصور نیز الل های غیر تیپ از آلل رقم شـــاهد قابل پایش بود. در بذور رقم عادل با این نشانگر سه آلل متفاوت تکثیر شدکه آلل غالب رقم عادل با توجه عدم یکنواختی نمونه شـاهد قابل شـناسـایی نبود. به همین ترتیب نمونه‌های مشکوک و مورد مقایسه با شاهد تنوع آللی با نشانگر H1A06دا شتند. در نمونه شاهد رقم آرمان ۲ آلل شنا سایی شده که آلل غالب در بین نمونه ها کاملا مشـــخص بود. نمونه های مشـکوک تنوع آللی در مقایســه با آلل غالب داشـتند و به عنوان خارج تیپ یا سایر رقم در نظر گرفته شدند. در تکثیر با نشانگر H3C11شش آلل در بذور مشکوک رقم عادل شناسایی شد که با توجه به تنوع آلل بین نمونه‌ها امکان شـــناســـایی آلل غالب وجود نداشـت. نمونه های مشـکوک به عادل نیز تنوع آللی داشـتند که اختلاط با ســایر ارقام در این رقم به شـــدت مشـــخص می‌باشـد. نشانگر H3C11 به ترتیب سه و دو آلل در ارقام منصور و آرمان تکثیر نمود که که آلل های مربوط به ســـایر ارقام در نمونه‌های شـاهد و مشـکوک قابل شـناسـایی بود. الگوی تکثیری نشـانگر H3F09در نمونه‌های شاهد عادل و منصور چهار آلل و آرمان سه آلل شنا سایی شد. آلل‌های سایر ارقم در بین نمونه‌های شاهد و نمونه‌های مشکوک مشخص و قابل ردیابی بود (شکل ۳).

از نه نشـانگر بررســی شـــده در SSR، ســه نشـانگر H3F09، H3C11 و H1A06 تنوع آللی مربوط به سایر ارقام را در نمونه‌های شاهد و مشکوک ارقام عادل، منصور و آرمان شنا سایی نمودند ( شکل۳ ). نتایج برر سی ماهیت ژنتیکی ارقام نخود با نشانگرهای ریزماهواره نشـــان داد محموله های بذری ارقام عادل، منصـــور و آرمان خلوص و یکنواختی ژنتیکی وجود ندارد. بنابراین ضرورت دارد از ماهیت ژنتیکی ارقام نخود در مراحل مختلف تولید بذر با روش‌های بیوشـمیایی، مورفولوژیکی و مولکولی اطمینان حاصـل شود و نسبت به شناسایی بوته‌های خارج از تیپ یا وجود بوته‌های ســـایر ارقام در مزارع تولید بذر اقدامات بهینه انجام شـــود. بدیهی اســـت حذف بو ته های خارج از تیپ و تولید بذر خالص در ســـیســـتم‌های تولید بذر در حفظ و ارتقای خلوص ژنتیکی بذور اثرگذار خواهد بود.




شکل۲- تغییرات رنگ بذرهای مشکوک به خارج تیپ (Off types) نسبت به شاهد (Control) در ارقام عادل، آرمان و منصور در آزمون NaOH (A) و آزمون KOH (B). اعداد روی ظروف مربوط به کد نمونه‌های مورد ارزیابی در آزمایشات هستند.

Figure 2- Color changes of suspected off-type seeds compared to control in Adel, Arman and Mansour cultivars in NaOH test (A) and KOH test (B). The numbers written on the container are the codes of the samples during the test.

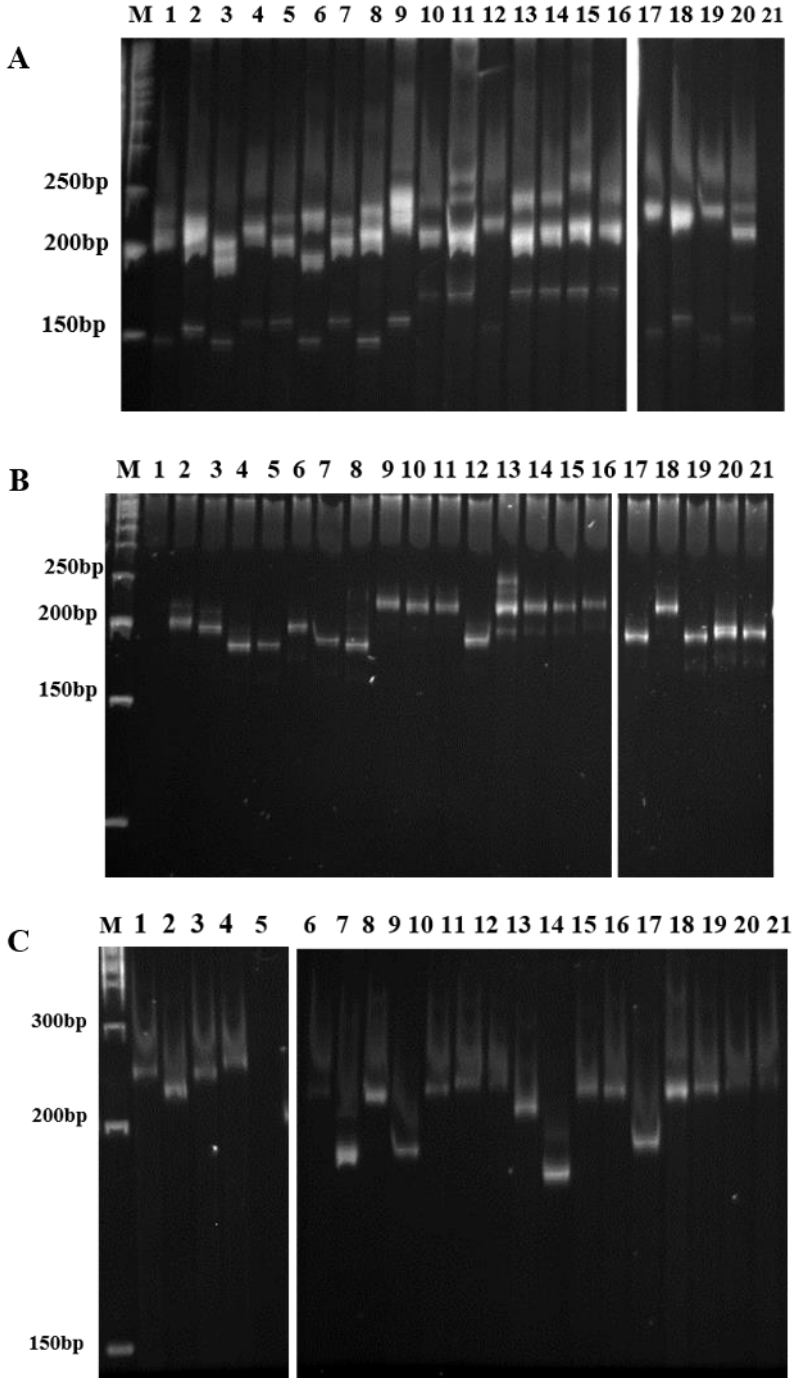
جدول۲- مشخصات مورفولوژیکی، شیمیایی و مولکولی بذر های خارج از تیپ ارقام مورد مطالعه در مقایسه با شاهد

Table 2- Morphological, chemical and molecular characteristics of out-of-type seeds of the studied cultivars compared to the control

| مشخصات نمونه<br>Sample specifications | تفاوت مورفولوژی بذر با شاهد<br>The difference in seed morphology with the control | تاریخ گلدهی نسبت به شاهد<br>Flowering date compared to the control | رنگ گل<br>flower color | تاریخ غلاف دهی نسبت به شاهد<br>Podding date compared to the control | مدل بوته<br>Plant model | ارتفاع بوته<br>plant height | واکنش هیدرو کسید سدیم<br>Sodium hydroxide reaction | واکنش هیدرو کسید پتاسیم<br>Potassium hydroxide reaction | خارج از تیپ با استفاده از نشانگر های ریزماهواره<br>Out of type using SSR markers |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Adel (control) | | | white | 2019/5/25 | standing | high | - | - | |
| Suspected seed Adel 2906-1 | Color, shape and furrow of the seed | 5 days earlier | Purple | 2019/5/19 | standing | high | +++ | ++++ | + |
| Suspected seed Adel 2906-5 | Color, shape, furrow and roughness of the seed surface | 6 days earlier | white | 2019/5/19 | standing | Short | ++ | +++ | + |
| Suspected seed Adel3811-5 | Color, shape and groove of the seed | 6 days later | white | 2019/5/28 | standing | medium | + | + | + |
| Suspected seed Adel3811-9 | Color, shape and furrow of the seed | same time | white | 2019/5/25 | standing | high | + | ++ | + |
| Suspected seed Adel34045-3 | Color, shape and furrow of the seed | 6 days later | white | 2019/5/28 | standing | high | + | ++ | + |
| Suspected seed Adel34045-4 | Color, shape and furrow of the seed | 7 days later | white | 2019/6/1 | standing | Short | + | + | + |
| Mansour(control) | | | white | 2019/6/8 | standing | medium | ++ | - | |
| Suspected seed Mansour 3814-5 | Color, seed furrow | 7 days earlier | white | 2019/5/28 | standing | medium | + | + | + |
| Suspected seed Mansour 3814-7 | Seed shape and furrow | 13 days earlier | white | 2019/5/25 | standing | medium | ++ | + | + |
| Suspected seed Mansour 4046-2 | furrow | 6 days earlier | white | 2019/5/29 | standing | Short | + | + | + |
| Suspected seed Mansour 4046-6 | color and roughness of the seed surfac | 13 days earlier | white | 2019/5/25 | standing | medium | + | - | + |
| Arman(control) | | | white | 2019/5/26 | standing | Short | + | ++ | |
| Suspected seed Arman 4096-6 | Shape, furrow and roughness of seed surface | 11days later | white | 2019/6/8 | standing | Short | + | + | + |
| Suspected seed Arman 4096-8 | shape, groove and roughness of the seed surface | 4 days later | white | 2019/5/29 | standing | Short | - | + | + |
| Suspected seed Arman 4712-2 | Grooves and roughness of the seed surface | same time | white | 2019/5/25 | standing | medium | + | + | + |
| Suspected seed Arman 4712-4 | shape, groove and roughness of the seed surface | 4 days later | white | 2019/5/29 | standing | Short | ++ | + | + |

-: بدون رنگ؛ +: رنگ زرد روشن؛ ++: رنگ زرد تیره؛ +++: عسلی، ++++: قهوه ای

-: Without color; +: light yellow color; ++: dark yellow color; +++: honey, ++++: brown




شکل ۳- شناسایی نمونه‌های خارج از تیپ در ارقام عادل، منصور و آرمان با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره.

A: الگوی تکثیر نشانگر H3C11 به ترتیب M: خط کش ژنومی ۵۰ جفت بازی، شماره‌های ۱-۸ مربوط به تنوع ژنتیکی در رقم عادل، ۹-۱۶ رقم منصور و شماره‌های ۱۷-۲۱ رقم آرمان، B: الگوی تکثیر نشانگر H1A06 به ترتیب M: خط کش ژنومی ۵۰ جفت بازی، شماره‌های ۱-۸ مربوط به تنوع ژنتیکی رقم عادل، ۹-۱۶ رقم منصور و شماره‌های ۱۷-۲۱ رقم آرمان. C: الگوی تکثیر نشانگر H3F09 به ترتیب M: خط کش ژنومی ۱۰۰ جفت بازی، شماره‌های ۱-۵ مربوط به تنوع ژنتیکی رقم آرمان، ۶-۱۴ رقم عادل و شماره‌های ۱۵-۲۱ رقم منصور.

Figure 3- Identification of off-type seeds using SSR markers in Adel, Mansour and Arman cultivars. A: Amplification profile of H1A06 marker. M: Size Marker 50 bp, Lines of 1-8 related to genetic variation in Adel, 9-16 Mansor and lines 17-21 are Arman Respectively. B: Amplification profile of H3C11 marker. M: Size Marker 50 bp, Lines of 1-8 to genetic variation in Adel, 9-16 Mansor and lines 17-21 are Arman Respectively C: Amplification profile of H3F09 marker. M: Size Marker 50 bp, Lines of 1-5 to genetic variation in Arman, 6-14 Adel and lines 15-21 are Mansour Respectively.

خلوص بذر یکی از مهمترین ویژگی‌های کیفیت بذر می‌باشد (Maravilla et al., 2017). شناسایی و مشخص نمودن خصوصیات ارقام برای برنامه‌های توسعه، آزادسازی رقم و تولید بذر ضروری می‌باشد. حفظ خلوص ژنتیکی بذر در تولید موفق محصول، شرط اساسی بوده به‌طوری که کشاورزان تنها زمانی می‌توانند از پتانسیل کامل هر بذر استفاده کنند که بذرهای با خلوص ژنتیکی بالا تهیه نمایند (Pattanaik et al., 2018). ارزیابی خصوصیات مورفولوژیکی علاوه بر اینکه می‌تواند تحت تاثیر محیط باشد، زمان‌بر بوده و نیاز به صرف هزینه‌های زمین و نیروی کار است. از این رو استفاده از الگوهای اختصاصی هر رقم به کمک نشانگر های مبتنی بر DNA بازدهی فعالیت را ارتقاء می‌دهد (Mangal et al., 2016). پیش از این نیز نشانگر های مولکولی در تشخیص بذور خارج از تیپ یا آلودگی‌های سایر ارقام همراه با ویژگی‌های فنوتیپی مندرج در دستورالعمل آزمون تمایز، یکنواختی و پایداری به عنوان یک ابزار موثر در ارقام سایر محصولات نیز مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Cockram et al., 2015). با این وجود، لزوم به روزرسانی دوره‌ای و استفاده از نشانگرهای جدید به دلیل احتمال ظهور آلل‌های جدید ناشی از جهش‌های خود به خودی با توجه به رقم توصیه شده است (Saccomanno et al., 2020). نشانگرهای ریزماهواره کارایی و دقت لازم را در تمایز بذور خارج از تیپ در نمونه های بذری را دارا هستند. ریزماهواره‌ها به دلیل ماهیت چند آللی، تکرارپذیری و پوشش مناسب ژنومی (Hamblin et al., 2007) می‌توانند در مدت زمان کوتاهی نتایج قابل توجهی از تعیین خلوص ژنتیکی ارقام در برنامه‌های به‌نژادی و تولید بذور گواهی شده و پایش مرحله به مرحله طبقات بذری در دسترس قرار دهند.

در مطالعه حاضر، ارزیابی‌های مولکولی مؤید نتایج ارزیابی ویژگی‌های فنوتیپی در شناسایی بذرهای خارج از تیپ بود. شناسایی الگوهای اختصاصی در توالی ژنوم هر رقم گیاهی ابزار قدرتمندی را برای بررسی وجود کمیت تنوع ژنتیکی در ژرم پلاسم انواع گیاهان فراهم می‌کند. توالی های اختصاصی ریزماهواره‌ها در تعیین اصالت و خلوص بذر بسیاری از گونه‌های گیاهی مهم در تعداد زیاد شناسایی شده اند (Gupta and Varshney, 2000; Pallavi et al., 2011) و در شناسایی ژنوتیپ‌ها و ناخالصی‌های ژنتیکی به عنوان یک گزینه کاربردی موفق بوده و یک مکمل در روش های مرسوم مورفولوژیکی می‌تواند نقش تکمیلی و رفع کننده ابهامات موجود باشد (Azizi et al., 2021; Cregan,1997; Diwan and Naresh et al., 2009; Duhan et al., 2020; Hong et al., 2021; Jiao et al., 2012; Ohyama et al. 2017). با توجه به نتایج پژوهش حاضر، استدلال می شود برخی از صفات مورفولوژیکی پایدار بذر از جمله رنگ بذر، شیار سطح بذر، منقار بذر و میزان زبری سطح بذر می‌توانند به عنوان صفات جداسازی بذرهای خارج از تیپ در نمونه های بذری نخود استفاده شوند و مواردی که اطمینان در تفکیک حاصل نمی‌شود برای ارائه‌ی نتایج قطعی از آزمون‌های شیمیایی و مولکولی استفاده نمود.

## تعارض منافع

نویسندگان این مقاله اعلام می‌دارند که هیچ گونه تعارض منافعی در رابطه با نگارش و یا انتشار این مقاله ندارند.

## References

**Anonymous. (2019).** *National standard of seed production (Chickpea)*. Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO).

**Anonymous. (2020).** *International rules for seed testing*. International Seed Testing Association (ISTA).

**Bonetti, A., Miggiano, A., Dinelli, G., & Lovato, A. (1995).** Identification of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars grown in Italy by field and electrophoresis tests: A comparative study. *Seed Science and Technology*, *23*, 69-84.

**Bonow, S., Pinho, E. V. R., Von Soares, A. A., & Siecolo Junior, S. (2007).** Morphological characteristics of cultivars, application for variety purity certification. *Ciencia e Agrotecnologia*, *31*(3), 619-627.

**Bonow, S., Von Pinho, E. V. R., Vieira, M. G. C., & Vosman, B. (2009).** Microsatellite markers in and around rice genes: Applications in variety identification and DUS testing. *Crop Science*, *49*(3), 880-886. https://doi.org/10.2135/cropsci2008.06.0380

**Bussell, J. D., Waycott, M., & Chappill, J. A. (2005).** Arbitrarily amplified DNA markers as characters for phylogenetic inference. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, *7*(1), 3-26. https://doi.org/10.1016/j.ppees.2004.07.001

**Button, P. (2006).** New developments in the International Union for the Protection of New Varieties of Plants. *Acta Horticulturae*, *714*(22), 195–210. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2006.714.22

**Chaghamirza, K., & Mohammadi, R. (2013).** Evaluation of cultivars and native populations of chickpea (*Cicer arietinum* L.) based on agrophysiological traits in rainfed conditions. *Agricultural Researches of Iran*, *11*(3), 460-472. [In Persian]

**Chowdhury, M. A., Bert Vandenberg, & Warkentin, T. (2002).** Cultivar identification and genetic relationship among selected breeding lines and cultivars in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Euphytica*, *127*(1-2), 317-325.

**Cockram, J., Horsnell, R., Soh, E. H., Norris, C., & O'Sullivan, D. M. (2015).** Molecular and phenotypic characterization of the alternative seasonal growth habit and flowering time in barley (*Hordeum vulgare* ssp. *vulgare* L.). *Molecular Breeding*, *35*(8), 1-11. https://doi.org/10.1007/s11032-015-0359-5

**Cooke, R. J. (1995).** Varietal identification of crop plants. In J. H. Skerritt & R. Apples (Eds.), *New diagnostics in crop sciences* (pp. 33-63). CAB International.

**Cox, T. S., & Murphy, J. P. (1990).** The effect of parental divergence on F2 heterosis in winter wheat crosses. *Theoretical and Applied Genetics*, *79*(2), 241-250. https://doi.org/10.1007/BF00225958

**De Riek, J., Calsyn, E., Everaert, I., Van Bockstaele, E., & De Loose, M. (2001).** AFLP based alternatives for the assessment of Distinctness, Uniformity and Stability of sugar beet varieties. *Theoretical and Applied Genetics*, *103*, 1254-1265. https://doi.org/10.1007/s001220100710

**Eser, D., Gectt, H. H., & Mclier, H. Y. (1991).** Evaluation of germplasm in chickpea landraces in Turkey. *International Chickpea Newsletter*, *24*, 22-23.

**Eshete, M., & Fikre, A. (2011).** *Guide for CHICKPEA (Cicer arietinum L.) production in the Southern Nations, Nationalities, and Peoples' Region of Ethiopia*. University of Saskatchewan and Hawassa University.

**FAOSTAT. (2017).** *Crops*. http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E. Accessed February 3, 2017.

**Farooq, M., Nadeem, F., Gogoi, N., Ullah, A., Alghamdi, S. S., & Siddique, K. H. M. (2017a).** Heat stress in grain legumes during reproductive and grain-filling phases. *Crop & Pasture Science*, *68*, 985–1005. https://doi.org/10.1071/CP17012

**Farooq, M., Gogoi, N., Barthakur, S., Baroowa, B., Bharadwaj, N., Alghamdi, S. S., & Siddique, K. H. M. (2017b).** Drought stress in grain legumes during reproduction and grain filling. *Journal of Agronomy and Crop Science*, *203*(2), 81–102. https://doi.org/10.1111/jac.12169

**Giancola, S., Marcucci-Poltri, S., Lacaze, P., & Hopp, H. E. (2002).** Feasibility of integration of molecular markers and morphological descriptors in a real case study of a plant variety protection system for soybean. *Euphytica*, *127*(1), 95-113. https://doi.org/10.1023/A:1019923923805

**Gunjaca, J., Buhinicek, I., Jukic, M., Sarcevic, H., Vragolovic, A., Kozic, Z., Jambrovic, A., & Pejic, I. (2008).** Discriminating maize inbred lines using molecular and DUS data. *Euphytica*, *161*(1), 165-172. https://doi.org/10.1007/s10681-007-9518-z

**Gupta, P. K., & Varshney, R. K. (2000).** The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica*, *113*(3), 163-185. https://doi.org/10.1023/A:1003910819967

**Hamblin, M. T., Warburton, M. L., & Buckler, E. S. (2007).** Empirical comparison of simple sequence repeats and single nucleotide polymorphisms in assessment of maize diversity and relatedness. *PLOS ONE*, *2*(12), e1367. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001367

**Hosni, H., Nabati Ahmadi, D., Mishchipour, P., & rubella, K. (2015).** Evaluation of genetic diversity and heritability of quantitative traits in cable type chickpea genotypes under dry conditions. *Journal of Iranian Legume Research*, *7*(1), 121-134. [In Persian]

**Jannatabadi, A. A., Talebi, R., Armin, M., Jamalabadi, J., & Baghebani, N. (2014).** Genetic diversity of Iranian landrace chickpea (*Cicer arietinum* L.) accessions from different geographical origins as revealed by morphological and sequence tagged microsatellite markers. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, *23*(2), 225–229. https://doi.org/10.1007/s13562-013-0206-x

**Jukanti, A. K., Gaur, P. M., Gowda, C. L., & Chibbar, R. N. (2012).** Nutritional quality and health benefits of chickpea (*Cicer arietinum* L.): A review. *The British Journal of Nutrition*, *1*(S1), S11-S26. https://doi.org/10.1017/S0007114512000797

**Katagi, A., Patil, R. M., & Paramagoudar, K. R. C. (2014).** Tools for Genetic Purity Testing of Horticultural Crops- A Review. *Hortflora Research Spectrum*, *3*(2), 108-113.

**Kwon, Y. S., Lee, J. M., Yi, G. B., Yi, S. I., Kim, K. M., Soh, E. H., Bae, K. M., Park, E. K., Song, I. H., & Kim, B. D. (2005).** Use of SSR markers to complement tests of distinctiveness, uniformity, and stability (DUS) of pepper (*Capsicum annuum* L.) varieties. *Molecules and Cells*, *19*(3), 428-435.

**Lalitha, A. (2007).** *Varietal characterization of chickpea (Cicer arietinum) varieties* [Master's thesis].

**Lichtenzveig, J., Scheuring, C., Dodge, J., Abbo, S., & Zhang, H. B. (2005).** Construction of BAC and BIBAC libraries and their applications for generation of SSR markers for genome analysis of chickpea, *Cicer arietinum* L. *Theoretical and Applied Genetics*, *110*(3), 492-510. https://doi.org/10.1007/s00122-004-1857-8

**Liu, Z.-W., Biyashev, R. M., & Saghai-Maroof, M. A. (1996).** Development of simple sequence repeat DNA markers and their integration in to a barley linkage map. *Theoretical and Applied Genetics*, *93*(5-6), 869-876. https://doi.org/10.1007/BF00224088

**Lombard, V., Baril, C. P., Dubreuil, P., Blouet, F., & Zhang, D. (2000).** Genetic relationships and fingerprinting of rapeseed cultivars by AFLP: Consequences for varietal registration. *Crop Science*, *40*, 1417-1425. https://doi.org/10.2135/cropsci2000.4051417x

**Macha, S. (2010).** *Characterisation and assessment of genetic purity through grow out test and molecular markers of Dch-32 cotton hybrid* (Doctoral dissertation). University of Agricultural Sciences, Dharwad.

**Magloire, N. (2005).** *The genetic, morphological and physiological evaluation of African cowpea genotypes* (Master's thesis). University of the Free State, Department of Plant Sciences (Plant Breeding).

**Mangal, M., Upadhyay, P., & Kalia, P. (2016).** Characterization of cultivated and wild genotypes of brinjal (*Solanum melongena* L.) and confirmation of hybridity using microsatellite markers. *Vegetos*, *29*(2), 27-34. https://doi.org/10.5958/2229-4473.2016.00016.1

**Maravilla, A. M. B., Ocampo, E. T. M., Canama, A. O., & Delfin, E. F. (2017).** Hybridity testing of eggplant F1 progenies derived from parents with varying response to drought using SSR markers. *Philippine Journal of Science*, *146*(3), 277-286.

**Mardi, M., Talei, A., & hope, M. A. (2012).** Investigation of genetic diversity and identification of yield components in Desi type chickpea. *Iranian Journal of Agricultural Sciences*, *2*(34), 345-351. [In Persian]

**Mc Donald, M. B., Jr. (1985).** AOSA cultivar purity subcommittee report. *AOSA Newsletter*, *59*(1), 40-57.

**Monica, A., Joshi, N., Sarao, R. C., Sharma, P. S., & Bharaj, T. S. (2007).** Varietal characterization of rice (*Oryza sativa* L.) based on morphological descriptors. *Seed Research*, *35*(2), 188-193.

**Muralidharan, V., & Manivannan, N. (2001).** Genetic diversity in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *National Symposium on Pulses and Oilseeds for Sustainable Agriculture*, 71.

**Naresh, V., Yamini, K. N., Rajendrakumar, P., & Dinesh Kumar, V. (2009).** EST-SSR marker-based assay for the genetic purity assessment of safflower hybrids. *Euphytica*, *170*(3), 347-353. https://doi.org/10.1007/s10681-009-9995-3

**Nethra, N., Rajendra Prasad, S., Vishwanath, K., Dhanraj, K. N., & Ramegowda. (2007).** Identification of rice hybrids and their parental lines based on seed, seedling characters, chemical tests and gel electrophoresis of Total soluble proteins. *Seed Science and Technology*, *35*(1), 176-186. https://doi.org/10.15258/sst.2007.35.1.16

**Nikolić, Z., Vujaković, M., & Jevtić, A. (2008).** Genetic purity of sunflower hybrids determined on the basis of isozymes and seed storage proteins. *Helia*, *31*(48), 47-54. https://doi.org/10.2298/hel0848047n

**Nizami, A., Puramir, F., Momeni, P., Persa, H., Ganjali, A., & Bagheri, A. (2018).** Evaluation of the phenological, morphological and functional characteristics of a part of chickpea germplasm collection of Mashhad Ferdowsi University seed bank, a: Desi type chickpeas. *Journal of Iranian Legume Research*, *1*(2), 21-36. [In Persian]

**Oliveira, M. B., Vieira, E. S. N., & Schuster, I. (2010).** Construction of a molecular database for soybean cultivar identification in Brazil. *Genetics and Molecular Research*, *9*(2), 705-720. https://doi.org/10.4238/vol9-2gmr706

**Pallavi, H. M., Gowda, R., Shadakshari, Y. G., Bhanuprakash, K., & Vishwanath, K. (2011).** Identification of SSR markers for hybridity and seed genetic purity testing in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Helia*, *34*, 59-66. https://doi.org/10.2298/hel1154059p

**Papp, E., Korosi, F., & Kemeny, A. (1997).** Identification of seeds of *Brassica* species on the basis of spectrophotometry of seed extracts. *Seed Science and Technology*, *25*, 577-580.

**Paran, I., Horowitz, M., Zamir, D., & Wolf, S. (1995).** Random amplified polymorphic DNA markers are useful for purity determination of tomato hybrids. *HortScience*, *30*(2), 377. https://doi.org/10.21273/HORTSCI.30.2.377

**Patil, B. N. K., Macha, S., Motagi, B. N., Vijayakumar, A. G., & Hanchinal, R. R. (2006).** Characterization of safflower varieties through chemical tests. *Proceedings of XII National Seed Seminar on prosperity through quality seed*, 168.

**Pattanaik, A., Reddy, L. D., Singh, T. H., Pandiyaraj, P., & Chennareddy, A. (2018).** Optimization of sampling size for DNA-based PCR assay for hybrid purity test in the brinjal, *Solanum melongena*. *Bioscience Biotechnology Research Communications*, *11*(3), 496-504. https://doi.org/10.21786/bbrc/11.3/20

**Punia, R. C., Chandgi, R., Tomer, R. P. S., & Anita, M. (2002).** Cultivar identification of wheat by modified phenol tests. *Seed Tech News*, *32*(1), 97.

**Reid, A., & Kerr, E. M. (2007).** A rapid simple sequence repeat (SSR)-based identification method for potato cultivars. *Plant Genetic Resources*, *5*(1), 7-13. https://doi.org/10.1017/S1479262107192133

**Saccomanno, B., Wallace, M., O'Sullivan, D. M., & Cockram, J. (2020).** Use of genetic markers for the detection of off-types for DUS phenotypic traits in the inbreeding crop, barley. *Molecular Breeding*, *40*(1), 1-10. https://doi.org/10.1007/s11032-019-1088-y

**Saeed, A., Hovsepyan, H., Darvishzadeh, R., Imtiaz, M., Panguluri, S. K., & 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*(4), 848–858. https://doi.org/10.1007/s11105-011-0294-5

**Sankarapandian, R. (2002).** Identifying some pulse cultivars based on key characters alone among popular varieties of Tamil Nadu. *Seed Technology News*, *32*(1), 146.

**Sarao, N. K., Vikal, Y., Singh, K., Joshi, M. A., & Sharma, R. C. (2009).** SSR marker-based DNA fingerprinting and cultivar identification of rice (*Oryza sativa* L.) in Punjab state of India. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*, *8*(1), 42-44. https://doi.org/10.1017/S1479262109990128

**Scarano, D., Rao, R., Masi, P., & Corrado, G. (2015).** SSR fingerprint reveals mislabeling in commercial processed tomato products. *Food Control*, *51*(1), 397-401. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.12.006

**Singh, R. K., Sharma, R. K., Singh, A. K., Singh, V. P., Singh, N. K., Tiwari, S. P., & Mohapatra, T. (2004).** Suitability of mapped sequence tagged microsatellite site markers for establishing distinctness, uniformity and stability in aromatic rice. *Euphytica*, *135*(2), 135-143. https://doi.org/10.1023/B:EUPH.0000014905.10397.08

**Smykal, P., Horacek, J., Dostalova, R., & Hybl, M. (2008).** Variety discrimination in pea (*Pisum sativum* L.) by molecular, biochemical and morphological markers. *Journal of Applied Genetics*, *49*(2), 155-166. https://doi.org/10.1007/BF03195609

**Tommasini, L., Batley, J., Arnold, G. M., Cooke, R. J., Donini, P., Lee, D., Law, J. R., Lowe, C., Moule, C., Trick, M., & Edwards, K. J. (2003).** The development of multiplex simple sequence repeat (SSR) markers to complement distinctness, uniformity and stability testing of rape (*Brassica napus* L.) varieties. *Theoretical and Applied Genetics*, *106*(6), 1091-1101. https://doi.org/10.1007/s00122-002-1125-8

**Upadhyaya, H. D., Dwivedi, S. L., Baum, M., Varshney, R. K., Udupa, S. M., & Gowda, C. L. L. (2008).** Genetic structure, diversity, and allelic richness in composite collection and reference set in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *BMC Plant Biology*, *8*(1), 106. https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-106

**UPOV (International Union for the Protection of New Varieties of Plants). (1991).** *International convention for the protection of new varieties of plants* (Publication No. 221 (E)). Geneva.

**UPOV (International Union for the Protection of New Varieties of Plants). (2010).** *Guidelines for DNA-profiling: Molecular marker selection and database construction ("BMT guidelines")* (Publication No. proj.17). Geneva.

**UPOV (International Union for the Protection of New Varieties of Plants). (2005).** *Guidelines for the conduct of tests for distinctness, homogeneity and stability, chickpea* (TG/143/4).

**Vanangamudi, K., Palanisamy, V., & Natesan, P. (1998).** Variety determination in rice - phenol and potassium hydroxide tests. *Seed Science and Technology*, *16*, 465-470.

**Varshney, R. K., Coyne, C. J., Swamy, P., & Hoisington, D. (2008).** Molecular identification of genetically distinct accession in the USDA chickpea core collection. *Genetics*, *93*, 32-33.

**Vishwanath, K., Pallavi, H. M., Nethra, N., & Rajendra Prasad, S. (2013).** Chemical tests for identification and characterization of tomato cultivar. *Plant Breeding and Seed Science*, *67*(1), 1-11. https://doi.org/10.2478/v10129-011-0076-0

**Winter, P., Benko-Iseppon, A. M., Hüttel, B., Ratnaparkhe, M., Tullu, A., Sonnante, G., Pfaf, T., Tekeoglu, M., Santra, D., Sant, V. J., Rajesh, P. N., Kahl, G., & Muehlbauer, F. J. (2000).** A linkage map of chickpea (*Cicer arietinum* L.) genome based on recombinant inbred lines from a *C. arietinum* × *C. reticulatum* cross: Localization of resistance genes for Fusarium wilt races 4 and 5. *Theoretical and Applied Genetics*, *101*(7), 1155–1163.

**Yadav, R. D. S., & Srivastava, J. P. (2002).** DUS characteristics of chickpea varieties. *Seed Technology News*, *32*(1), 29.

**Zali, H., Farshadfar, A., Sabbaghpur, S. H., Pazshakpour, P., & Hashem Begi, A. (2017).** Agricultural characteristics and genetic diversity of 17 chickpea genotypes. *Agricultural Research: Water, Soil and Plants in Agriculture*, *8*(1), 169-181.