

## مطالعه ساختار و تنوع ژنتیکی جمعیت‌های یونجه زراعی

ISSR با استفاده از نشانگرهای (*Medicago sativa L.*)

حیدر عزیزی<sup>۱</sup>، ایرج برنوسری<sup>۲</sup>، بابک عبدالهی مندولکانی<sup>\*</sup><sup>۳</sup>، رضا درویش‌زاده<sup>۴</sup>

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیاران دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه

۴- استادیار گروه زراعت و اصلاح باتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه

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

(تاریخ دریافت: ۸۹/۱۲/۳ - تاریخ پذیرش: ۹۰/۳/۲۹)

### چکیده

استفاده از منابع ژنتیکی در اصلاح گیاهان نیازمند مطالعه دقیق تنوع ژنتیکی جمعیت‌های گیاهی است. به این منظور ساختار و تنوع ژنتیکی ۸۰ ژنوتیپ از ۸ جمعیت مختلف یونجه زراعی استفاده ۱۱۷ مکان قابل امتیازبندی تولید کردند که از این تعداد ۹۱ مکان در بین و درون جمعیت-ها چندشکل بودند. میانگین مقادیر PIC (Polymorphic information content) برای آغازگرهای مورد استفاده ۰/۷۷ و از ۰/۶۵ (آغازگر UBC849) تا ۰/۹۳ (آغازگر ۴۴۳) متغیر بود. دندروگرام حاصل از تجزیه کلاستر بر اساس UPGMA مبتنی بر ضرایب فاصله ژنتیکی نی، جمعیت‌ها را در سه کلاستر اصلی قرار داد. بیشترین و کمترین فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها به ترتیب ۰/۱۲۸ (قره یونجه ملک کندی و همدانی) و ۰/۰۵۴ (ترکیه ساکوقل و بغدادی) بود. متوسط میانگین هتروژنیتی در جمعیت‌های مورد مطالعه ۰/۲۸۵ و از ۰/۲۶۷ (بغدادی) تا ۰/۳۰۹ (ترکیه ساکوقل و محلی اصفهانی) متغیر بود. نتایج حاصل از تجزیه واریانس ملکولی (AMOVA) تنوع ژنتیکی بالایی را در درون جمعیت‌ها (۹۱ درصد) در مقایسه با بین جمعیت‌ها (۹ درصد) نشان داد. تجزیه کلاستر بر اساس روش Complete Linkage مبتنی بر ضرایب تشابه دایس، ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را در ۶ گروه هتروتیک قرار داد. جمعیت‌هایی با فاصله ژنتیکی مناسب یا افراد متعلق به گروه‌های هتروتیک مختلف می‌توانند به طور بالقوه به عنوان والدین تلاقی در برنامه‌های اصلاحی یونجه مورد استفاده قرار گیرند.

### واژه‌های کلیدی

تجزیه واریانس ملکولی،

نشانگرهای ISSR

یونجه زراعی (*Medicago sativa L.*)

### مقدمه

یونجه (*Medicago sativa L.*) یکی از مهم‌ترین گیاهان علوفه‌ای ایران و جهان به شمار می‌رود که از قفقاز، شمال غربی ایران، ارتفاعات ترکمنستان و شمال شرقی ترکیه متولد شده است. علیرغم اهمیت زراعی این گیاه، پیشرفت‌های حاصل از برنامه‌های اصلاحی در این گیاه بخاطر توارث تترزاومی، پسروی خویش‌آمیزی شدید و پیچیدگی ساختار ژنتیکی آن نسبت به گیاهان دیگر چندان چشمگیر نبوده است.

AFLP (۳۱، ۲۴)، SSR (۳۲، ۱۷)، ISSR (۳۳) و EST-SSR (۵) برای ارزیابی تنوع و مطالعه ساختار ژنتیکی در جمعیت‌های یونجه گزارش شده است. از نشانگرهای ISSR نیز در خربزه (۲)، سیب‌زمینی شیرین (۲۱)، توتون (۱۲)، تریتیکاله (۱۶) و گل رز (۱۹) جهت بررسی تنوع و ساختار ژنتیکی استفاده شده است. این نشانگرها مبتنی بر استفاده از توالی‌های ریزماهواره با یک یا چند باز لنگر در انتهای<sup>۳</sup> یا<sup>۵</sup> به عنوان آغازگر می‌باشد و ناحیه بین دو ریزماهواره نزدیک به هم در ژنوم را تکثیر می‌کند. در این روش نیازی به اطلاعات در مورد توالی ژنومی جهت طراحی آغازگر نمی‌باشد و هر توالی ریزماهواره با یک یا چند باز لنگر در انتهای<sup>۳</sup> یا<sup>۵</sup> به عنوان آغازگر استفاده می‌شود. بازهای لنگر از اتصال آغازگر در داخل توالی ریزماهواره در نقاط مختلف جلوگیری کرده و تعداد مکان‌های ژنومی تکثیر شده را کاهش می‌دهد. نشانگرهای ISSR چند مکانی بوده و چندشکلی نسبتاً بالایی را نشان می‌دهند و ابزار مناسبی برای تمایز ارقام و جمعیت‌های گیاهی می‌باشند. تعداد مکان‌های تکثیری را می‌توان با تغییر تعداد و نوع بازهای لنگر تغییر داد (۳۳). هدف از این تحقیق مطالعه ساختار و تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مختلف یونجه، شناسایی جمعیت‌هایی با فاصله ژنتیکی مناسب و تعیین گروه‌های هترووتیک در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه به عنوان والدین تلاقی برای تولید ارقام ساختگی و هیبرید بود.

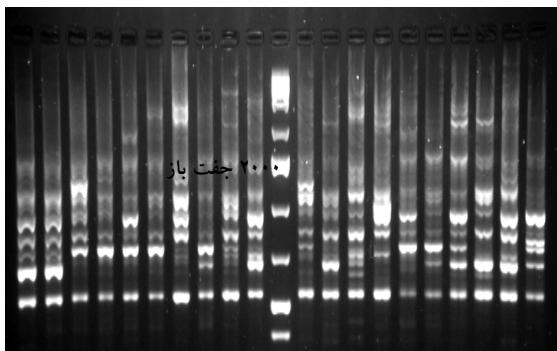
### مواد و روش‌ها

#### مواد گیاهی و استخراج DNA

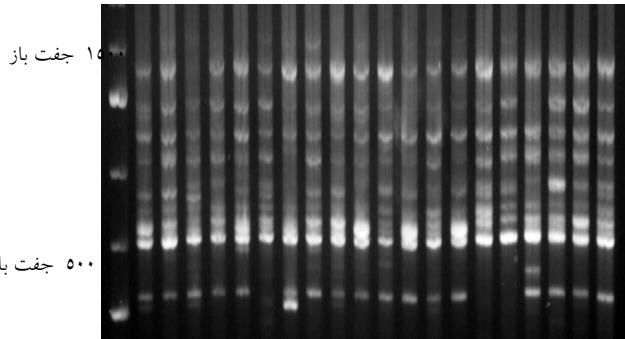
مواد گیاهی شامل ۸۰ ژنوتیپ از ۸ جمعیت قره‌یونجه ملک‌کندي، قره‌یونجه اروميه، محلی اصفهان، بغدادي، همداني، آذربايجان اردوبار، تركيه ۱ و تركيه ساکوئيل بود (جدول ۱). بذور ابتدا در ظروف پتروی جوانه‌دار شده و سپس به گلدان منتقل شدند. پس از رشد گیاهچه‌ها در گلخانه از هر جمعیت ۱۰ نمونه بطور تصادفي انتخاب و از برگ‌های سالم و سبز هر گیاه نمونه‌برداری برای استخراج DNA به روش CTAB (۱۴) انجام گرفت. ارزیابی کیفیت و کمیت DNA ای استخراج شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز یک درصد و اسپکتروفتومتری صورت گرفت. DNA-های ژنومی با کیفیت مطلوب برای انجام واکنش‌های PCR در غلظت ۳۰ نانوگرم در میکرولیتر رقیق شدند.

از طرف دیگر به خاطر میزان زیاد دگرگشته، گرده افسانی باز و ایترگرسیون بین گونه‌های *M. sativa* با *M. falcata* یونجه گیاه بسیار هتروزیگوتی است که تنوع ژنتیکی زیادی در بین ارقام آن دیده می‌شود. وجود چنین اختلاف ژنتیکی گسترده در بین افراد جمعیت یونجه، مطالعات مربوط به ژنتیک جمعیت این محصول را پیچیده‌تر نموده است (۲۸، ۳۰). استفاده از منابع ژنتیکی در برنامه‌های اصلاحی نیازمند مطالعه دقیق تنوع ژنتیکی جمعیت‌های گیاهی است. این موضوع بویژه در مورد یونجه برای تولید ارقام ساختگی مهم می‌باشد زیرا که تولید ارقام ساختگی مبتنی بر انتخاب والدین متنوع و دارای عملکرد مطلوب بوده تا در نتیجه آن، حداکثر هتروزیس در نتاج حاصل گردد (۳، ۸). از طرف دیگر اطلاع از میزان چندشکلی یا تفاوت بین نمونه‌های مختلف، به منظور کاهش حجم نمونه‌های ذخایر تواری نگهداری شده در بانک ژن و بررسی خلوص بذر به خصوص در گیاه دگرگشته مانند یونجه بسیار مفید خواهد بود. درک تغییرات ژنتیکی و تنوع ارقام محلی یونجه و مشخص نمودن خصوصیات مهم زراعی آن-ها، فرصتی ایجاد خواهد کرد که اصلاح کنندگان یونجه با توجه به شاخص‌های مورد نظر خود به اصلاح این محصول مهم با دقت و آگاهی بیشتری اقدام نمایند. چنین بررسی‌هایی در ایران که به عنوان یکی از رستنگاه‌های اولیه یونجه منظور شده و توده-های محلی متنوعی دارد مهم است (۵، ۶، ۷). استفاده از هتروزیس و تولید ارقام ساختگی به عنوان یک روش موثر برای اصلاح عملکرد علوفه و سایر صفات مهم زراعی در یونجه پیشنهاد شده است. استفاده از ژنوتیپ‌هایی با فاصله ژنتیکی و قابلیت ترکیب‌پذیری مناسب به عنوان والدین هیبرید یا ارقام ساختگی نتاجی با عملکرد بهتر تولید خواهد کرد (۲، ۳). نشانگرهاي مورفولوژيك عليرغم كاريابي بالا در تشخيص و طبقه-بندي گونه‌ها، به علت تاثيرپذيری از محیط كاريابي كمتری در تعیین میزان تنوع ژنتیکی دارند (۳۲). پیشرفت‌های علم ژنومیکس علاقه‌مندی محققین را به استفاده از نشانگرهای ملکولی در شناسایی والدین با فاصله ژنتیکی مناسب جهت تولید ارقام ساختگی و هیبرید در برنامه‌های اصلاحی افزایش داده است (۱۵، ۲۱، ۲۴، ۲۷). كاريابي نشانگرهاي ملکولی مختلفی مانند نشانگرهاي پروتئيني (۴)، RAPD (۱۰، ۲۰، ۲۷)، RFLP (۹، ۱۱) را در میکرولیتر رقیق شدند.

های کوفتیک مربوطه با استفاده از نرم افزار NTSYSpc نسخه ۲/۰۲ (۲۹) محاسبه گردید.



شکل ۱- الگوی باندی آغازگر A12 روی جمعیت‌های محلی اصفهان (۱۰ فرد اول سمت راست نشانگر اندازه) و آذربایجان اردوبار (۱۰ فرد سمت چپ نشانگر اندازه)، نشانگر اندازه O'GeneRuler™ (فرمتاز) یک کیلویاز می-باشد



شکل ۲- الگوی باندی آغازگر UBC808 روی جمعیت‌های محلی اصفهان (۱۰ فرد اول از سمت راست) و آذربایجان اردوبار (۱۰ فرد دوم از سمت راست)، نشانگر اندازه O'GeneRuler™ (فرمتاز) یک کیلویاز می-باشد

تجزیه واریانس ملکولی<sup>۱</sup> (AMOVA) (بهمنظور برآورد اجزای واریانس بین گیاهان داخل جمعیت‌ها و بین جمعیت‌ها و پارامترهای مربوط به ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها از جمله تعداد مکان‌های اختصاصی جمعیت (۲۳)، تعداد مکان‌های با فراوانی کمتر از ۵۰ درصد (۲۳) و میانگین هتروزیگوستی (۱۸) نیز با نرم افزار GenAIEx نسخه ۶ (۲۴) محاسبه شدند. میانگین هتروزیگوستی از طریق فرمول  $\sum pi^2 - 1 = He$  محاسبه گردید که در این فرمول  $pi$  فراوانی آلل آن می-باشد.

### نتایج و بحث

از ۲۱ آغازگر ISSR مورد استفاده ۱۵ آغازگر الگوی باندی مشخص و چندشکل و یک آغازگر الگوی باندی مشخص ولی

<sup>1</sup> Analysis of molecular variance

جدول ۱- جمعیت‌های یونجه مطالعه شده و منشا آن‌ها

جمعیت	منشا	کد جمعیت‌های مورد مطالعه
قره یونجه ملک کندی	ایران- خوی	GhM
قره یونجه ارومیه	ایران- ارومیه	GhO
محلی اصفهانی	ایران- اصفهان	MEs
بغدادی	ایران- کرمان	Bagh
همدانی	ایران- همدان	Ham
آذربایجان اردوبار	آذربایجان	AOrd
ترکیه ۱	ترکیه	Tu1
ترکیه ساکوئل	ترکیه	TuS

واکنش زنجیره ای پلیمراز

آغازگر ISSR (۱۶، ۱۹، ۲۱) دو و سه نوکلتوتیدی دارای یک یا دو باز انکور در انتهای<sup>۳</sup> برای مطالعه تنوع ژنتیکی در بین ۸۰ فرد از ۸ جمعیت یونجه استفاده شد (جدول ۲). واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۴۵ نانوگرم (Tris-HCl 10 mM, 50 mM KCl, DNA، بافر PCR یک برابر  $MgCl_2$ , ۰/۲ میکرومول از هر dNTP،  $pH=8.3$ )، ۱/۵ میلیمول از هر  $MgCl_2$ ، ۰/۵ واحد آنزیم تک پلیمراز و ۱۰ پیکومول از هر PerkinElmer-Applied Biosystems ترموسایکلر برناهه دمایی واکنش زنجیره ای پلیمراز بصورت: ۴ دقیقه و اسرشت سازی اولیه در ۹۴ درجه و ۳۵ چرخه شامل ۴۰ ثانیه در ۹۴ درجه (جهت واسرت-سازی)، ۴۰ ثانیه در ۵۴ درجه (جهت اتصال آغازگرها) و ۲ دقیقه در ۷۲ درجه (جهت بسط) و بسط نهایی در ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه بود. تفکیک محصولات تکثیری با استفاده از ژل آگارز ۱/۸ درصد و بافر TBE نیم برابر با ولتاژ ۹۰ انجام شد و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید صورت گرفت. شکل یک الگوی باندی آغازگر ۸۴۸ را روی جمعیت‌های بغدادی و قره یونجه ملک کندی نشان می-دهد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

امتیازدهی باندها به صورت یک برای وجود باند و صفر برای عدم وجود باند انجام گرفت. ماتریس صفر و یک برای محاسبه فاصله ژنتیکی نی (۲۵) بین جمعیت‌ها با استفاده از نرم افزار GenAIEx نسخه ۶ (۲۶) استفاده گردید. تجزیه کلاستر جمعیت‌ها به روش UPGMA با استفاده از فاصله ژنتیکی نی، تجزیه کلاستر افراد مورد مطالعه با استفاده از الگوریتم Complete Linkage مبتنی بر ضرایب تشابه دایس برای تعیین گروه‌های هتروتیک و ضرایب همبستگی کوفتیک بین ماتریس‌های فاصله و تشابه و ماتریس-

نی بین جمعیت‌ها از ۰/۰۵۴ (ترکیه ساکوئل و بغدادی) تا ۰/۱۲۸ (قره یونجه ملک‌کندي و همدانی) متغیر بود. بالا بودن دامنه فاصله ژنتیکی نشان از تنوع بالای جمعیت‌های مورد مطالعه می‌باشد و از جمعیت‌هایی با فاصله ژنتیکی زیاد می‌توان به عنوان والدین تلاقي در برنامه‌های اصلاحی یونجه استفاده کرد. تجزیه کلاستر به روش UPGMA جمعیت‌ها را در سه گروه اصلی (شکل ۲) قرار داد. جمعیت قره یونجه ملک‌کندي به تنها‌ی در گروه اول قرار گرفت. گروه دوم شامل دو زیر گروه بود. زیر گروه اول شامل جمعیت‌های ترکیه ساکوئل، بغدادی، ترکیه ۱ و آذربایجان اردوبار و زیر گروه دوم شامل جمعیت‌های محلی اصفهانی و همدانی بود. سه گروه دوم شامل جمعیت‌های محلی اصفهانی و همدانی بود. سه گروه دوم شامل جمعیت خارجی در زیر گروه مشابهی قرار گرفتند. جمعیت قره یونجه ارومیه نیز همانند جمعیت قره یونجه ملک‌کندي به تنها‌ی در گروه سوم قرار گرفت. با توجه به فاصله جغرافیایی زیاد دو جمعیت قره یونجه از دیگر جمعیت‌های مورد مطالعه، قرار گرفتن آنها در گروه‌های جداگانه قابل انتظار بود. نتایج حاصل از تجزیه کلاستر با تجزیه به مختصات اصلی (PCO<sup>1</sup>) نیز تایید شد (شکل ۳). در تجزیه به مختصات اصلی مولفه‌های اول و دوم به ترتیب ۳۶ و ۲۱ درصد کل تنوع موجود در جمعیت‌های مورد مطالعه را توجیه می‌کردند.

برای ارزیابی تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت‌ها، تجزیه واریانس ملکولی (AMOVA) بر اساس جمعیت‌های مورد مطالعه انجام شد. نتایج بدست آمده نشان داد که اختلاف معنی‌داری (P<0.010) درون جمعیت‌ها وجود دارد و تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها (۹۱ درصد) در مقایسه با بین جمعیت‌ها (۹ درصد) بیشتر می‌باشد. تنوع زیاد درون جمعیتی حاصل از این مطالعه احتمالاً به خاطر هتروزیگوستی و دگرگشته یونجه و قابلیت بالای آشکارسازی چندشکلی توسط نشانگرهای ISSR می‌باشد.

<sup>1</sup> Principle coordinate analysis

مونومورف تولید کردند (جدول ۲). ۱۱۷ مکان توسط ۱۶ آغازگر تکثیر شد که از این تعداد ۹۱ مکان چندشکل (۷۸ درصد) بودند. متوسط مکان‌های چندشکل برای هر آغازگر ۶۰۷ بود. بالا بودن چندشکلی بدست آمده در پژوهش حاضر را می‌توان به کارایی بالای روش ISSR، وسعت مناطق جغرافیائی نمونه برداری شده، هتروزیگوستی و دگرگشته یونجه و به تعداد زیاد ژنوتیپ‌های مورد بررسی نسبت داد (۱۲، ۱۳، ۳۰). همچنین از آنجا که در روش ISSR-PCR آغازگرها مکمل نواحی ریز ماهواره‌ای می‌باشند که در یوکاریوت‌ها با فراوانی بالا در سراسر زنوم پراکنده‌اند بنابراین استفاده از این روش می‌تواند سطح بالایی از چندشکلی را آشکار سازد (۳۳). میزان محتوای اطلاعات چندشکل (PIC) از ۰/۶۵ (آغازگر ۹۳ UBC849) تا ۰/۹۳ (آغازگر ۴۴۳) متغیر بود. مقادیر PIC بسیاری از آغازگرها مورد استفاده زیاد بود که نشان دهنده انتخاب صحیح و کارایی بالای این آغازگرها می‌باشد (جدول ۲). مقادیر بالای PIC و چندشکلی برای آغازگرها در مطالعات دیگری نیز گزارش شده است (۲، ۱۹). میزان PIC به عواملی مانند تعداد آل‌های هر جایگاه، محتوای نوکلئوتیدی آغازگرها انتخاب شده بستگی دارد که در این مطالعه آغازگرها مورد استفاده بر اساس مطالعات قبلی انتخاب شده بودند (۱۵، ۱۸، ۲۰) و سعی شده بود آغازگرها بی انتخاب شوند که میزان چندشکلی بالایی در مطالعات قبل نشان داده بودند که این می‌تواند توجیه کننده مقادیر بالای PIC در این مطالعه باشد. در کل آغازگرها با توالی دو نوکلئوتیدی آغازگرها و تعداد مکان‌های چندشکل زیادی تولید کردند. دامنه اندازه باندی مکان‌های تکثیر شده از ۲۵۰ تا ۴۵۰۰ جفت باز متغیر بود (جدول ۲). درصد مکان‌های چندشکل در جمعیت‌ها از ۶۲/۳۹ درصد (جمعیت ترکیه ۱) تا ۶۹/۲۳ درصد (جمعیت‌های ترکیه ساکوئل و محلی اصفهانی) متغیر بود (جدول ۳). فراوانی همه مکان‌های تکثیر شده بیش از ۵۰ درصد بود که بیانگر شایع بودن مکان‌های تکثیر شده در جمعیت‌های مورد مطالعه می‌باشد. میانگین هتروزیگوستی از ۰/۲۶۷ (بغدادی) تا ۰/۳۰۹ (ترکیه ساکوئل و محلی اصفهانی) متغیر بود. متوسط میانگین هتروزیگوستی ۰/۲۸۵ بود که با توجه به میزان دگرگرده افسانی و هتروزیگوستی زیاد یونجه این سطح از تنوع قابل انتظار بود (۲۵، ۲۶). فاصله ژنتیکی

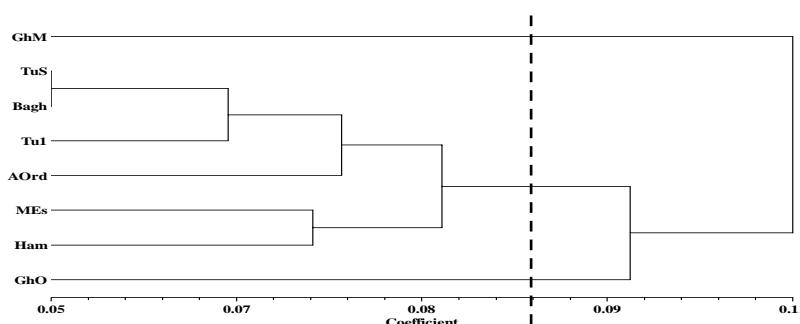
جدول ۲- توالی آغازگرهای ISSR استفاده شده، تعداد کل مکان‌های تکثیر شده، تعداد مکان‌های چند شکل، محتوای اطلاعات چند شکل (PIC) و دامنه اندازه باندی

آغازگر	توالی آغازگر	تعداد مکان‌های تکثیر شده	تعداد مکان‌های چند شکل	محتوای اطلاعات چند شکل (PIC)	دامنه اندازه باندی (جفت باز)
۴۲۵	(CA) <sub>10</sub> G	۷	۶	۰/۸۵	۸۰۰-۳۰۰۰
۴۲۶	(CAC) <sub>7</sub> T	۳	۰	۰/۸۱	۲۵۰-۲۵۰۰
۴۳۸	(AC) <sub>6</sub> G	۵	۵	۰/۹۲	۸۰۰-۴۰۰۰
۴۴۰	(AC) <sub>6</sub> C	۴	۳	۰/۸۸	۱۵۰۰-۳۰۰۰
۴۴۳	(AC) <sub>6</sub> T	۳	۳	۰/۹۳	۱۵۰۰-۴۵۰۰
۴۵۶	(ACC) <sub>6</sub> C	۷	۵	۰/۷۳	۸۰۰-۱۵۰۰
۴۵۹	(TGC) <sub>6</sub> C	۳	۲	۰/۸۹	۸۰۰-۱۳۰۰
۸۲۵	(AC) <sub>7</sub> T	۱۲	۱۱	۰/۷۴	۵۰۰-۲۵۰۰
۸۴۸	(CA) <sub>8</sub> G	۱۰	۹	۰/۷۶	۱۵۰۰-۳۰۰۰
A7	(AG) <sub>10</sub> T	۶	۲	۰/۶۹	۶۰۰-۲۲۰۰
A12	(GA) <sub>6</sub> CC	۷	۴	۰/۷۷	۵۰۰-۲۵۰۰
A13	(GT) <sub>6</sub> CC	۹	۶	۰/۶۶	۷۰۰-۲۰۰۰
B1	(TC) <sub>10</sub> C	۱۰	۹	۰/۷۳	۱۳۰۰-۳۵۰۰
UBC808	(CA) <sub>7</sub> G	۱۲	۱۰	۰/۷۲	۱۰۰۰-۳۰۰۰
UBC812	(GA) <sub>8</sub> A	۱۰	۸	۰/۶۸	۶۰۰-۳۰۰۰
UBC849	(GT) <sub>8</sub> CG	۹	۸	۰/۶۵	۶۰۰-۲۰۰۰
مجموع میانگین		۱۱۷	۹۱	۰/۷۲	
مجموع میانگین			۶/۰۷	۰/۷۷	

جدول ۳- خصوصیات مکان‌های ISSR تکثیر شده در جمعیت‌های یونجه مطالعه شده

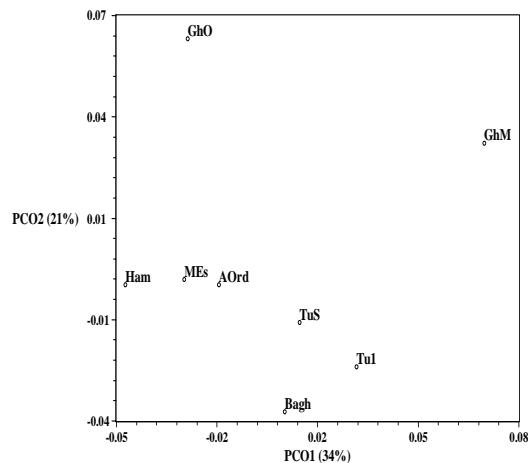
جمعیت	تعداد مکان	GhM*	TuS	MEs	Bagh	Ham	GhO	Aord	Tu1
درصد مکان‌های چندشکل	۱۱۷	۱۱۷	۱۱۷	۱۱۶	۱۱۷	۱۱۷	۱۱۷	۶۵/۸۱	۶۲/۳۹
تعداد مکان‌های اختصاصی	.	.	.	.	.	.	.	۶۷/۵۲	۶۵/۸۱
جمعیت	.	.	.	.	.	.	.	۶۵/۸۱	۶۷/۵۲
تعداد مکان‌ها با فراوانی کمتر از ۵۰ درصد	.	.	.	.	.	.	.	۰/۲۸۳	۰/۲۷۰
میانگین هتروزیگوستی	.	.	.	.	.	.	.	۰/۲۸۷	۰/۲۸۲
اشتباه استاندارد میانگین هتروزیگوستی	.	.	.	.	.	.	.	۰/۳۰۹	۰/۳۰۹
اشتباه استاندارد میانگین هتروزیگوستی	.	.	.	.	.	.	.	۰/۲۷۱	۰/۲۷۱
۰/۰۲۰	۰/۰۲۰	۰/۰۱۹	۰/۰۲۰	۰/۰۲۰	۰/۰۱۹	۰/۰۱۹	۰/۰۱۹	۰/۰۱۹	۰/۰۲۰

قره یونجه ملک کندي، TuS: تركيه ساکوئيل، Bagh: بغدادي، AOrd: آذربایجان اردوبار، GhO: محلی اصفهاني، Ham: همداني و GhM\*: قره یونجه اروميه )



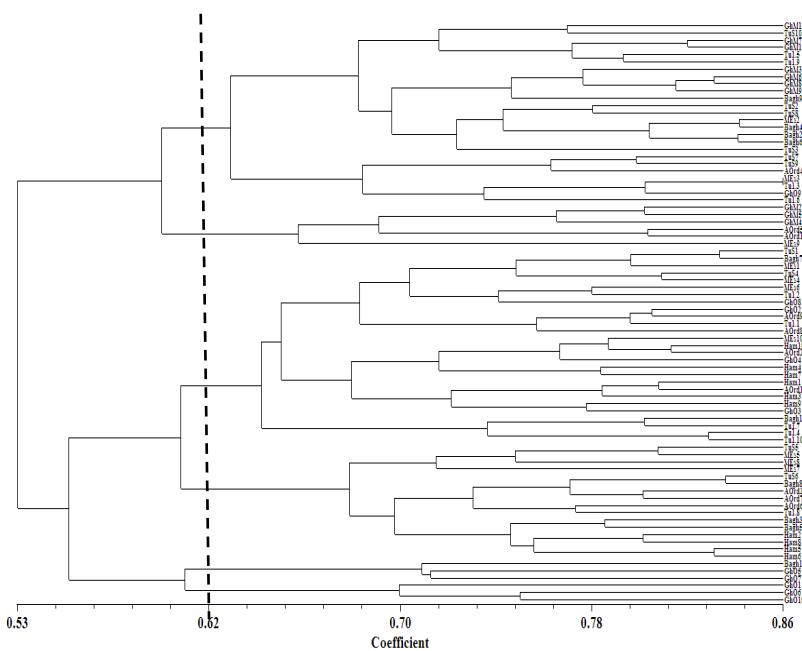
شكل ۲- دندروگرام ۸ جمعیت یونجه تترابلوئید مبتنی بر ضرایب فاصله ژنتیکی نی به روش UPGMA حاصل از ۱۶ آغازگر ISSR (GHM: قره یونجه ملک کندي، TuS: تركيه ساکوئيل، Bagh: بغدادي، Tu1: تركيه ۱، AOrd: آذربایجان اردوبار، MEs: محلی اصفهاني، Ham: همداني و GhO: قره یونجه اروميه )

فاکتورهای دیگری مانند قابلیت ترکیب‌پذیری و فاصله ژنتیکی بر اساس صفات مورفو‌لوزیک را نیز در نظر گرفت (۸، ۹). مطالعات مختلف حکایت از نتایج متناقض کاربرد تنوع ژنتیکی بر اساس نشانگرهای ملکولی در انتخاب والدین هیبریدها و ارقام ساختگی دارد (۲۲) بطوری‌که تخمین دقیق عملکرد نتاج در بسیاری از موارد با مشکل مواجه بوده است. شاید این مسئله را بتوان به عدم پیوستگی ژن‌های مورد علاقه به نشانگرهای ناسازگاری افراد انتخاب شده جهت تلاقي و خطاهای مربوط به نشانگرهای ملکولی نسبت داد (۱۳). با این حال با کشف وجود رابطه بین فاصله ژنتیکی و عملکرد علوفه در یونجه تراپلولئید (۳)، این امید پیدا شده است که نشانگرهای می‌توانند در برنامه‌های اصلاحی یونجه برای شناسایی متنوع‌ترین ژنوتیپ‌ها به عنوان والدین ارقام ساختگی و هیبریدها استفاده شوند (۱۵). با توجه به نتایج بدست آمده از این پژوهش و با مطالعات تکمیلی (مطالعه صفات مورفو‌لوزیک و استفاده از نشانگرهای مبتنی بر توالی ژن‌ها) می‌توان از جمعیت‌های مربوط به گروه‌های مختلف و ژنوتیپ‌های متعلق به گروه‌های هترووتیک متفاوت به عنوان والدین جهت تولید هیبرید، سمی هیبرید و ارقام سنتیک در یونجه استفاده کرد. همچنین نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که تنوع ژنتیکی بالای درون جمعیت‌های یونجه مورد مطالعه، برای انجام برنامه‌های اصلاحی و دورگیری جهت افزایش عملکرد، کیفیت و سازگاری این گیاه مناسب می‌باشد و به نظر می‌رسد که روش ISSR به همراه روش‌های آماری چند متغیره مانند تجزیه کلاستر پتانسیل قابل توجهی جهت بررسی روابط خویشاوندی و تنوع ژنتیکی یونجه‌های تراپلولئید را دارد. پیشنهاد می‌شود که برای اطمینان از نتایج حاصله از نشانگرهای مختلف و همچنین از تعداد زیادی آغازگر بویژه آغازگرهایی که نشانگرهای پیوسته با صفات زراعی مهم تولید می‌نمایند در مطالعات آتی استفاده شود.



شکل ۳- نمودار دو بعدی روابط ژنتیکی بین ۸ جمعیت یونجه تراپلولئید حاصل از تجزیه به مختصات اصلی (GhM: قره یونجه ملک کندی، TuS: ترکیه ساکوئل، Bagh: بغدادی، Tu1: ترکیه ۱، AOrd: آذربایجان اردوبار، MEs: محلی اصفهانی، Ham: همدانی و GhO: قره یونجه ارومیه)

اگر چه نشانگرهای ISSR تا حدودی جمعیت‌های مورد مطالعه را تمایز ساخت ولی میزان تمایز کلی بین جمعیت‌های مورد بررسی پایین بود ( $P = 0.089$  و  $\Phi_{IT} = 0.010$ ). تمایز پایین بین جمعیت‌ها در مطالعه حاضر احتمالاً به خاطر جریان ژنی و مهاجرت زیاد بین جمعیت‌ها می‌باشد. تمایز کم و مهاجرت و جریان ژنی زیاد بین جمعیت‌های یونجه تراپلولئید ایران در مطالعات قبلی نیز گزارش شده است (۱۷، ۵). با توجه به وجود تنوع ژنتیکی بالای درون جمعیت‌ها، گروه‌های هترووتیک جهت شناسایی والدین هیبریدها (۸) در بین ۸۰ ژنوتیپ مورد مطالعه با استفاده از تجزیه کلاستر به روش Complete linkage مبتنی بر ضرایب تشابه دایس تعیین شد. ژنوتیپ‌ها در سه گروه اصلی قرار گرفتند (شکل ۴) و هر کدام از گروه‌های اصلی نیز شامل دو زیر گروه بودند که می‌توانند معرف گروه‌های هترووتیک (جدول ۴) باشند. کمترین تشابه ژنتیکی (۰/۵۴۳)، بین ژنوتیپ‌های قره یونجه ارومیه ۷ (GhO7) و قره یونجه ملک کندی ۲ (GhM2) و بیشترین تشابه ژنتیکی (۰/۸۶۳)، بین ژنوتیپ‌های محلی اصفهانی ۳ (MEs3) و ترکیه ۳ (Tu1.3) بین ژنوتیپ‌های محلی اصفهانی ۳ مشاهده شد. میانگین تشابه ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها ۰/۶۹۶ بود. می‌توان از ژنوتیپ‌های مربوط به گروه‌های هترووتیک متفاوت به عنوان والدین تلاقي در برنامه‌های اصلاحی تولید هیبرید یا سمی هیبرید برتر بهره گرفت. البته فاصله ژنتیکی تنها عامل موثر در شناسایی والدین منابع برای تولید هیبرید نیست و باقیستی



شکل ۴- دندروگرام ۸۰ ژنوتیپ یونجه تراپلوبید به روش Complete linkage مبتنی بر ضرایب تشابه دایس حاصل از آغازگر ISSR (GhM: قره یونجه ملک‌کنندی، TuS: ترکیه ساکن، Bagh: بغدادی، Tu1: ترکیه ۱، AOrd: آذربایجان اردوبار، MEs: محلی اصفهانی، Ham: همدانی و GhO: قره یونجه ارومیه)

جدول ۴- گروه‌بندی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه یونجه زراعی در گروه‌های هتروتیک

گروه سوم		گروه دوم		گروه اول	
زیر گروه دوم	زیر گروه اول	زیر گروه دوم	زیر گروه اول	زیر گروه دوم	زیر گروه اول
GhO1	GhO5	Bagh3	GhO2	GhM2	GhM1
GhO6	GhO7	Bagh5	GhO3	GhM4	GhM3
GhO10	Bagh1	Bagh8	GhO4	GhM5	GhM6
		Tu1.8	GhO8	AOrd5	GhM7
		TuS5	Bagh7	AOrd10	GhM8
		TuS6	Bagh10	MEs9	GhM9
		MEs5	Tu1.1		GhM10
		MEs7	Tu1.2		GhO9
		MEs8	Tu1.4		Bagh2
		AOrd3	Tu1.7		GhO9
		AOrd6	Tu1.10		Bagh6
		AOrd7	TuS1		Bagh9
		Ham2	TuS4		Tu1.3
		Ham5	MEs1		Tu1.5
		Ham6	MEs4		Tu1.6
		Ham8	MEs6		Tu1.9
			MEs10		TuS2
			AOrd1		TuS3
			AOrd2		TuS7
			AOrd8		TuS8
			AOrd9		TuS9
			Ham1		TuS10
			Ham3		MEs2
			Ham4		MEs3
			Ham7		AOrd4
			Ham9		
			Ham10		

## منابع

۱. رضایی م، نقوی م، معالی امیری ر (۱۳۸۹) ارزیابی تنوع ژنتیکی در اکوپیهای یونجه زراعی (*Medicago sativa L.*) نواحی مرکزی و شرقی ایران با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره، مجله علوم زراعی ایران، ج ۱۲، ش ۴: ۵۳۲-۵۲۰.
۲. فابریکی اورنگ ص، شمس بخش م، جلالی جواران م، احمدی ج (۱۳۸۸) بررسی تنوع ژنتیکی توده‌های بومی خربزه ایرانی با استفاده از نشانگرهای ملکولی بین ریزماهواره ای (ISSR)، مجله زیست‌شناسی ایران، ج ۲۲، ش ۲: ۱۶۷-۱۷۷.
۳. فرشادفر م، فارغی ش، فرشادفر ع، و جعفری ع (۱۳۸۷) ارزیابی تنوع ژنتیکی یونجه با استفاده از شاخص‌های ریخت شناسی و شیمیایی، فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، ش ۱۶: ۱-۱۳.
۴. مانوسی ح، ولیزاده م، زهتاب سلامسی س، اهری زاد س، و سلوکی م (۱۳۸۹) بررسی تنوع ژنتیکی در ارقام بومی و سنتیک یونجه با نشانگرهای پروتئینی بذر، مجله علوم گیاهان زراعی ایران، ش ۴۱: ۱۱۳-۱۲۱.
5. Bahar M, Ghobadi S, Erfani Moghadam V, Yamchi A, Talebi Bodaf M, Kaboli MM and Mokhtarzadeh AA (2006) Evaluation of genetic diversity in Iranian alfalfa populations using EST-SSRs. Sciences and techniques in agriculture and natural resources 2: 141-153.
6. Barcaccia G, Albertin E, Tavoletti S, Falcinelli M and Veronesi F (1999) AFLP fingerprinting in *Medicago* spp: its development and application in linkage mapping. Plant Breeding, 118: 335-341.
7. Barcaccia G, Tosti N, Falistocco E and Veronesi F (1995) Cytological, morphological and molecular analysis of controlled progenies from meiotic mutants of alfalfa producing unreduced gametes. Theor Appl Genet, 91: 1008-1015.
8. Brummer EC (1999) Capturing heterosis in forage crop cultivar development. Crop Science, 32: 939- 943.
9. Brummer EC, Bouton JH and Kochert G (1995) Analysis of annual *Medicaogo* species using RAPD markers. Genome, 38: 362-367.
10. Brummer EC, Kochert G and Bouton JH (1991) RFLP variation in diploid and tetraploid alfalfa. Theor Appl Genet, 83: 89-96.
11. Crochemore ML, Huyghe C, Kerlan MC and Julier B (1996) Partitioning and distribution of RAPD variation in a set of populations of *Medicago sativa* complex. Agronomie, 16: 421-432.
12. Denduangboripant j, Setaphan S, Suwanprasart W and panha S (2010) Determination of local tobacco cultivars

- using ISSR molecular markers. Chiang Mai j. Sci, 37: 293-303.
13. Diwan N, Bhagwat AA, Bauchan GR and Cregan PB (1997) Simple sequence repeat DNA markers in alfalfa and perennial and annual *Medicago* species. Genome 40: 887-895.
14. Doyle JJ and Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 12: 13-15.
15. Echt CS, Kidwell KK, Knapp SJ, Obsorn TC and McCoy TJ (1993) Linkage mapping in diploid alfalfa (*Medicago sativa*). Genome, 37: 61-71.
16. Emel S (2010) Evaluation of ISSR markers to assess genetic variability and relationship among winter triticale (x triticosecale wittmack) cultivars. Pak. J. Bot, 42: 2755-2763.
17. Falahati-Anbaran M, Habashi AA, Esfahani M, Mohammadi SA and Gharayazi B (2007) Population genetic structure based on SSR markers in alfalfa (*Medicago sativa L.*) from various regions contiguous to the centres of origin of the species. Journal of Genetics 1: 59-63.
18. Hartl DL, Clark AG (1997) Principles of Population Genetics 3rd Ed, Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc.
19. Jabbarzadeh Z, khosh-khui M, salehi H and saberivand A (2010) Inter simple sequence repeat (ISSR) markers as reproducible and specific tools for genetic analysis of rose species. African journal of biotechnology, 37: 6091-6095.
20. Kidwell KK, Austin DF and Osborn TC (1994) RFLP evaluation of nine *Medicago* populations representing the original germplasm sources for north American alfalfa cultivars. Crop Sci, 34:230-236.
21. Li Q, Liu QC, Zhai H, Ma DF, Wang X, Li XQ and Wang YP (2008) Genetic diversity in main parents of sweetpotato in china as revealed by ISSR Markers. Acta Agron Sin, 34 (6): 972-977.
22. Liu ZQ, Pel Y and Pu ZJ (1999) Relationship between hybrid performance and genetic diversity based on RAPD markers in wheat, *Triticum aestivum L.* Plant Breeding, 118: 119-123.
23. Maguire TL, Peakall R, Saenger P (2002) Comparative analysis of genetic diversity in the mangrove species *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. (Avicenniaceae) detected by AFLPs and SSRs. Theoretical and Applied Genetics, 104: 388-398.
24. Mengoni A, Gori A and Bazzicalupo M (2000) Use of RAPD and microsatellite (SSR) variation to assess genetic relationships among populations of tetraploid alfalfa, *Medicago sativa*. Plant Breeding, 119: 113-117.
25. Nei M and Li WH (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 76: 5269-5273.
26. Peakall R and Smouse PE (2006) GenAIEx 6: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for

- teaching and research. Molecular Ecology Notes, 6: 288-295.
27. Pupilli F, Businelli S, Paolocci F, Scotti C, Damiani F and Arcioni S (1996) Extent of RFLP variability in tetraploid populations of alfalfa, *Medicago sativa*. Plant Breeding, 115: 106-112
28. Rezae A (1994) Alfalfa Breeding. University Publication Center (Markaze Nashr Daneshghahi), Tehran.
29. Rohlf FJ (1998) NTSYSpc, Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Applied Biostatistics, Inc., New York.
30. Veronesi F, Charles B and Huyghe C ( 2010) Alfalfa. Springer Sci, 395-436.
31. Yu P and Pauls KP (1993) Rapid estimation of genetic relatedness among heterogeneous populations of alfalfa by random amplification of bulked genomic DNA samples. Theor Appl Genet, 86:788-794.
32. Zaccardelli M, Gnocchi S, Carelli M and Scotti C (2003) Variation among and within Italian alfalfa ecotypes by means of bio-agronomic characters and amplified fragment length polymorphism analyses. Plant Breeding, 122: 61-65.
33. Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase reaction amplification. Genomics 20, 176-183.