ژنتیک نوین
دوره ششم، شماره ٤، زمستان ١٣٩٠
صفحه ٦٩-٦١

مطالعه ساختار و تنوع ژنتیکی جمعیت‌های یونجه زراعی (*Medicago sativa* L.) با استفاده از نشانگرهای ISSR

حیدر عزیزی[١]، ایرج برنوسی [٢]، بابک عبدالهی مندولکانی[*٣]، رضا درویش‌زاده[٤]

١، ٢ و ٣- به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد واستادیاران دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه
٤- استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه

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

(تاریخ دریافت: ٨٩/١٢/٣ - تاریخ پذیرش: ٩٠/٣/٢٩)

چکیده

استفاده از منابع ژنتیکی در اصلاح گیاهان نیازمند مطالعه دقیق تنوع ژنتیکی جمعیت‌های گیاهی است. به این منظور ساختار و تنوع ژنتیکی ٨٠ ژنوتیپ از ٨ جمعیت مختلف یونجه زراعی (*Medicago sativa* L.) با استفاده از نشانگرهای ISSR مورد بررسی قرار گرفت. ١٦ آغازگر مورد استفاده ١١٧ مکان قابل امتیازبندی تولید کردند که از این تعداد ٩١ مکان در بین و درون جمعیت-ها چندشکل بودند. میانگین مقادیر PIC (Polymorphic information content) برای آغازگرهای مورد استفاده ٠/٧٧ و از ٠/٦٥ (آغازگر UBC849) تا ٠/٩٣ (آغازگر ٤٤٣) متغیر بود. دندروگرام حاصل از تجزیه کلاستر به‌روش UPGMA مبتنی بر ضرایب فاصله ژنتیکی نی، جمعیت‌ها را در سه کلاستر اصلی قرار داد. بیشترین و کم‌ترین فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها به ترتیب ٠/١٢٨ (قره‌یونجه ملک‌کندی و همدانی) و ٠/٠٥٤ (ترکیه ساکوئل و بغدادی) بود. متوسط میانگین هتروزیگوسیتی در جمعیت‌های مورد مطالعه ٠/٢٨٥ و از ٠/٢٦٧ (بغدادی) تا ٠/٣٠٩ (ترکیه ساکوئل و محلی اصفهانی) متغیر بود. نتایج حاصل از تجزیه واریانس ملکولی (AMOVA) تنوع ژنتیکی بالایی را در درون جمعیت‌ها (٩١ درصد) در مقایسه با بین جمعیت‌ها (٩ درصد) نشان داد. تجزیه کلاستر بر اساس روش Complete Linkage مبتنی بر ضرایب تشابه دایس، ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را در ٦ گروه هتروتیک قرار داد. جمعیت‌هایی با فاصله ژنتیکی مناسب یا افراد متعلق به گروه‌های هتروتیک مختلف می‌تواند به‌طور 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 منشاء یافته است (٢٨). علیرغم اهمیت زراعی این گیاه، پیشرفت‌های حاصل از برنامه‌های اصلاحی در این گیاه بخاطر توارث تترازومی، پسروی خویش‌آمیزی شدید و پیچیدگی ساختار ژنتیکی آن نسبت به گیاهان دیگر چندان چشمگیر نبوده است.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-11]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.4.8.2]

از طرف دیگر به خاطر میزان زیاد دگرگشنی، گرده افشانی باز و اینترگرسیون بین گونه‌های *M. falcata* با *M. sativa*، 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 توارثی نگهداری شده در بانک ژن و بررسی خلوص بذر به خصوص در گیاه دگرگشنی 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 به‌عنوان یکی از رستنگاه‌های اولیه یونجه منظور شده و توده-های محلی متنوعی دارد مهم است (۵، ٦، ۷). استفاده از هتروزیس و تولید ارقام ساختگی به‌عنوان 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 به‌عنوان والدین هیبرید یا ارقام ساختگی نتاجی با عملکرد بهتر تولید خواهد کرد (۲، ۳). نشانگرهای مورفولوژیک علیرغم کارایی بالا در تشخیص و طبقه-بندی گونه‌ها، به علت تاثیرپذیری از محیط کارایی کم‌تری در تعیین میزان تنوع ژنتیکی دارند (۳، 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، ۲٤، ۲۷). کارایی نشانگرهای ملکولی مختلفی مانند نشانگرهای پروتئینی (٤)، RFLP (۱۰، ۲۰، ۲۷)، RAPD (۹، ۱۱، ۲٤، ۳۱) AFLP (٦، ۳۲)، SSR (۱۳، ۱۷) و EST-SSR (۵) برای ارزیابی تنوع و مطالعه ساختار ژنتیکی در جمعیت‌های یونجه گزارش شده است. از نشانگرهای ISSR (۳۳) نیز در خربزه (۲)، سیب‌زمینی شیرین (۲۱)، توتون (۱۲)، تریتیکاله (۱٦) 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 '۳ یا '۵ به عنوان آغازگر می‌باشد و ناحیه بین دو ریزماهواره نزدیک به هم در ژنوم را تکثیر می‌کنند. 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 '۳ یا '۵ 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 هتروتیک 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 ملک‌کندی، قره‌یونجه ارومیه، محلی اصفهان، بغدادی، همدانی، آذربایجان اردوبار، ترکیه ۱ و ترکیه ساکوئل بود (جدول ۱). بذور ابتدا در ظروف پتری جوانه‌دار شده و سپس به گلدان منتقل شدند. پس از رشد گیاهچه‌ها در گلخانه از هر جمعیت ۱۰ نمونه بطور تصادفی انتخاب و از برگ‌های سالم و سبز هر گیاه نمونه‌برداری برای استخراج DNA به روش CTAB (١٤) انجام گرفت. ارزیابی کیفیت و کمیت DNAی 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.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-11]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.4.8.2]

جدول۱- جمعیت‌های یونجه مطالعه شده و منشا آن‌ها

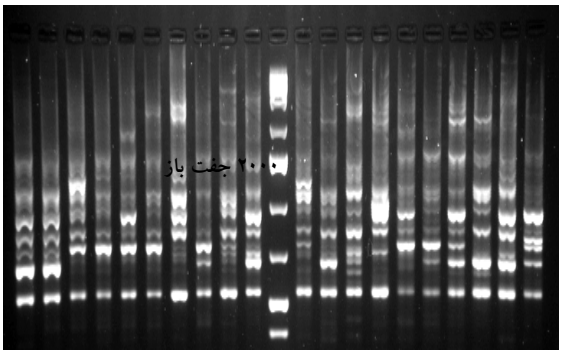
جمعیت	منشا	کد جمعیتهای مورد مطالعه
قره یونجه ملک کندی	ایران- خوی	GhM
قره یونجه ارومیه	ایران- ارومیه	GhO
محلی اصفهانی	ایران- اصفهان	MEs
بغدادی	ایران- کرمان	Bagh
همدانی	ایران- همدان	Ham
آذربایجان اردوبار	آذربایجان	AOrd
ترکیه ۱	ترکیه	Tu1
ترکیه ساکوئل	ترکیه	TuS

واکنش زنجیره ای پلیمراز

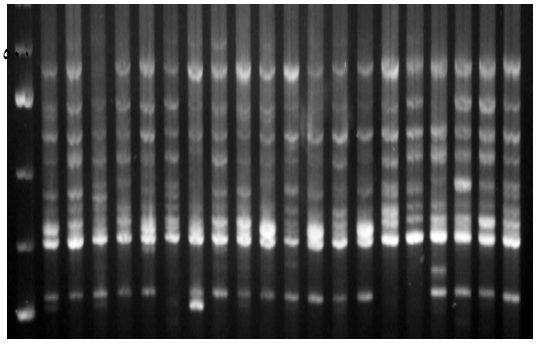
۲۱ آغازگر ISSR (۱٦، ۱۹، ۲۱) دو و سه نوکلئوتیدی دارای یک یا دو باز انکور در انتهای '۳ برای مطالعه تنوع ژنتیکی در بین ۸۰ فرد از ۸ جمعیت یونجه استفاده شد (جدول ۲). واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ٤٥ نانوگرم DNA، بافر PCR یک برابر (Tris-HCl 10 mM, 50 mM KCl, pH=8.3) ، ۱/۵ میلی‌مول $MgCl_2$، ۰/۲ میکرومول از هر dNTP، ۰/۵ واحد آنزیم تک پلیمراز و ۱۰ پیکومول از هر آغازگر در ترموسایکلر PerkinElmer–Applied Biosystems انجام شد. برنامه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بصورت: ٤ دقیقه واسرشت سازی اولیه در ۹٤ درجه و ۳۵ چرخه شامل ٤۰ ثانیه در ۹٤ درجه (جهت واسرشت‌سازی)، ٤۰ ثانیه در ٥٤ 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 ولتاژ۹۰ انجام شد و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید صورت گرفت. شکل یک الگوی باندی آغازگر ۸٤۸ را روی جمعیت‌های بغدادی و قره‌یونجه ملک کندی نشان می‌دهد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

امتیازدهی باندها به‌صورت 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 GenAlEx نسخه ٦ (۲٦) 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 کوفنتیک بین ماتریس‌های فاصله و تشابه و ماتریس‌های کوفنتیک 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^{TM} (فرمنتاز) یک کیلوباز می‌باشد



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'GeneRulerTM (فرمنتاز) یک کیلوباز می‌باشد

تجزیه واریانس ملکولی[1] (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 هتروزیگوسیتی (۱۸) نیز با نرم افزار GenAlEx نسخه ٦ (۲٤) محاسبه شدند. میانگین هتروزیگوسیتی از طریق فرمول $He= 1- \sum pi^2$ محاسبه گردید که در این فرمول pi فراوانی آلل iام می‌باشد.

نتایج و بحث

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

[1] Analysis of molecular variance

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-11]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.4.8.2]

مونومورف تولید کردند (جدول ۲). ۱۱۷ مکان توسط ۱٦ آغازگر تکثیر شد که از این تعداد ۹۱ مکان چندشکل (۷۸ درصد) بودند. متوسط مکان‌های چندشکل برای هر آغازگر ٦/۰۷ بود. بالا بودن چندشکلی بدست آمده در پژوهش حاضر را می‌توان به کارایی بالای روش ISSR، وسعت مناطق جغرافیائی نمونه برداری شده، هتروزیگوسیتی و دگرگشنی 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 ژنوم پراکنده‌اند بنابراین استفاده از این روش می‌تواند سطح بالایی از چندشکلی را آشکار سازد (۳۳). میزان محتوای اطلاعات چندشکل (PIC) از ۰/٦۵ (آغازگر UBC849) تا ۰/۹۳ (آغازگر ٤٤۳) متغیر بود. مقادیر PIC بسیاری از آغازگرهای مورد استفاده زیاد بود که نشان دهنده انتخاب صحیح و کارایی بالای این آغازگرها می‌باشند (جدول ۲). مقادیر بالای PIC و چندشکلی برای آغازگرهای ISSR در مطالعات دیگری نیز گزارش شده است (۲، ۱۹). میزان PIC به عواملی مانند تعداد آلل‌های هر جایگاه، محتوای نوکلئوتیدی آغازگرهای انتخاب شده بستگی دارد که در این مطالعه آغازگرهای مورد استفاده بر اساس مطالعات قبلی انتخاب شده بودند (۱۵، ۱۸، ۲۰) و سعی شده بود آغازگرهایی 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 آغازگرهای با توالی دو نوکلئوتیدی PIC و تعداد مکان‌های چندشکل زیادی تولید کردند. دامنه اندازه باندی مکان‌های تکثیر شده از ۲۵۰ تا ٤۵۰۰ جفت باز متغیر بود (جدول ۲). درصد مکان‌های چندشکل در جمعیت‌ها از ٦۲/۳۹ درصد (جمعیت ترکیه ۱) تا ٦۹/۲۳ 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 هتروزیگوسیتی از ۰/۲٦۷ (بغدادی) تا ۰/۳۰۹ (ترکیه ساکوئل و محلی اصفهانی) متغیر بود. متوسط میانگین هتروزیگوسیتی ۰/۲۸۵ بود که با توجه به میزان دگرگرده افشانی و هتروزیگوسیتی زیاد یونجه این سطح از تنوع قابل انتظار بود (۲۵، ۲٦). فاصله ژنتیکی نی بین جمعیت‌ها از ۰/۰٥٤ (ترکیه ساکوئل و بغدادی) تا ۰/۱۲۸ (قره یونجه ملک‌کندی 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 تلاقی در برنامه‌های اصلاحی یونجه استفاده کرد. تجزیه کلاستر به روش UPGMA جمعیت‌ها را در سه گروه اصلی (شکل۲) قرار داد. جمعیت قره یونجه ملک‌کندی به تنهایی در گروه اول قرار گرفت. گروه دوم شامل دو زیر گروه بود. زیرگروه اول شامل جمعیت‌های ترکیه ساکوئل، بغدادی، ترکیه ۱ و آذربایجان اردوبار و زیر گروه دوم شامل جمعیت‌های محلی اصفهانی و همدانی بود. سه جمعیت خارجی در زیرگروه مشابهی قرار گرفتند. جمعیت قره یونجه ارومیه نیز همانند جمعیت قره یونجه ملک‌کندی به تنهایی 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[1]) نیز تایید شد (شکل۳). در تجزیه به مختصات اصلی مولفه‌های اول و دوم به ترتیب ۳٤ 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 احتمالا به‌خاطر هتروزیگوسیتی و دگرگشنی یونجه و قابلیت بالای آشکارسازی چندشکلی توسط نشانگرهای ISSR می‌باشد (۱، ۲٤، ۲۸، ۳۰).

[1] Principle coordinate analysis

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-11]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.4.8.2]

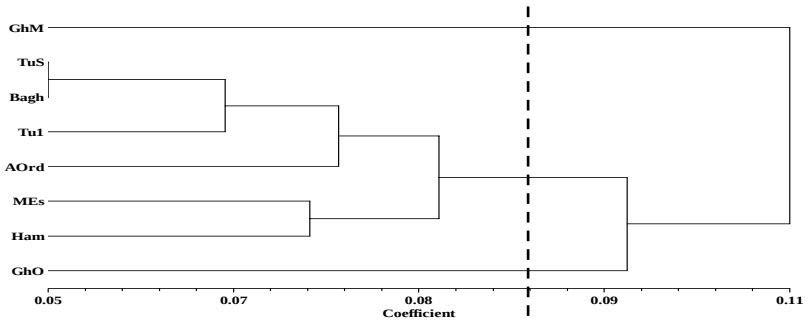
جدول ۲- توالی آغازگرهای ISSR استفاده شده، تعداد کل مکان‌های تکثیر شده، تعداد مکان‌های چند شکل، محتوای اطلاعات چند شکل (PIC) و دامنه اندازه باندی

آغازگر	توالی آغازگر	تعداد مکان‌های تکثیر شده	تعداد مکان‌های چند شکل	محتوای اطلاعات چند شکل (PIC)	دامنه اندازه باندی (جفت باز)
۴۲۵	$(CA)_{10}G$	۷	۶	۰/۸۵	۸۰۰-۳۰۰۰
۴۲۶	$(CAC)_7T$	۳	۰	۰/۸۱	۲۵۰-۲۵۰۰
۴۳۸	$(AC)_9G$	۵	۵	۰/۹۲	۸۰۰-۴۰۰۰
۴۴۰	$(AC)_9C$	۴	۳	۰/۸۸	۱۵۰۰-۳۰۰۰
۴۴۳	$(AC)_9T$	۳	۳	۰/۹۳	۱۵۰۰-۴۵۰۰
۴۵۶	$(ACC)_6C$	۷	۵	۰/۷۳	۸۰۰-۱۵۰۰
۴۵۹	$(TGC)_6C$	۳	۲	۰/۸۹	۸۰۰-۱۳۰۰
۸۲۵	$(AC)_7T$	۱۲	۱۱	۰/۷۴	۵۰۰-۲۵۰۰
۸۴۸	$(CA)_8G$	۱۰	۹	۰/۷۶	۱۵۰۰-۳۰۰۰
A7	$(AG)_{10}T$	۶	۲	۰/۶۹	۶۰۰-۲۲۰۰
A12	$(GA)_6CC$	۷	۴	۰/۷۷	۵۰۰-۲۵۰۰
A13	$(GT)_6CC$	۹	۶	۰/۶۶	۷۰۰-۲۰۰۰
B1	$(TC)_{10}C$	۱۰	۹	۰/۷۳	۱۳۰۰-۳۵۰۰
UBC808	$(CA)_7G$	۱۲	۱۰	۰/۷۲	۱۰۰۰-۳۰۰۰
UBC812	$(GA)_8A$	۱۰	۸	۰/۶۸	۶۰۰-۳۰۰۰
UBC849	$(GT)_8CG$	۹	۸	۰/۶۵	۶۰۰-۲۲۰۰
مجموع		۱۱۷	۹۱	۰/۷۲	
میانگین			۶/۰۷	۰/۷۷	

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

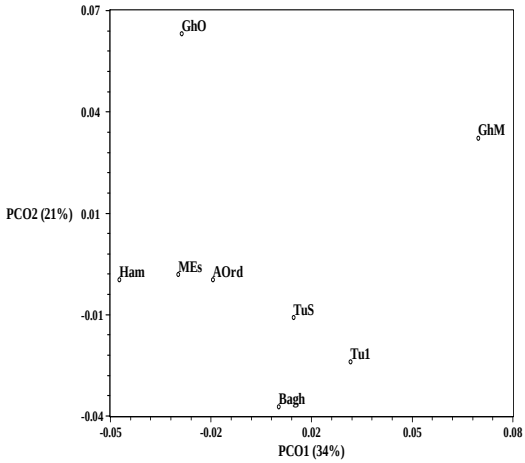
جمعیت	GhM*	TuS	MEs	Bagh	Ham	GhO	Aord	Tu1
تعداد مکان	۱۱۷	۱۱۷	۱۱۶	۱۱۷	۱۱۷	۱۱۷	۱۱۷	۱۱۷
درصد مکان‌های چندشکل	۶۳/۲۵	۶۹/۲۳	۶۹/۲۳	۶۳/۲۵	۶۵/۸۱	۶۷/۵۲	۶۵/۸۱	۶۲/۳۹
تعداد مکان‌های اختصاصی جمعیت	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
تعداد مکان‌ها با فراوانی کمتر از ۵۰ درصد	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
میانگین هتروزیگوسیتی	۰/۲۷۱	۰/۳۰۹	۰/۳۰۹	۰/۲۶۷	۰/۲۸۲	۰/۲۸۷	۰/۲۸۳	۰/۲۷۰
اشتباه استاندارد میانگین هتروزیگوسیتی	۰/۰۲۰	۰/۰۱۹	۰/۰۱۹	۰/۰۲۰	۰/۰۲۰	۰/۰۱۹	۰/۰۲۰	۰/۰۲۰

*(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)



شکل ۲- دندروگرام ۸ جمعیت یونجه تتراپلوئید مبتنی بر ضرایب فاصله ژنتیکی نی به روش UPGMA حاصل از ۱۶ آغازگر ISSR (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)

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-11]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.4.8.2]

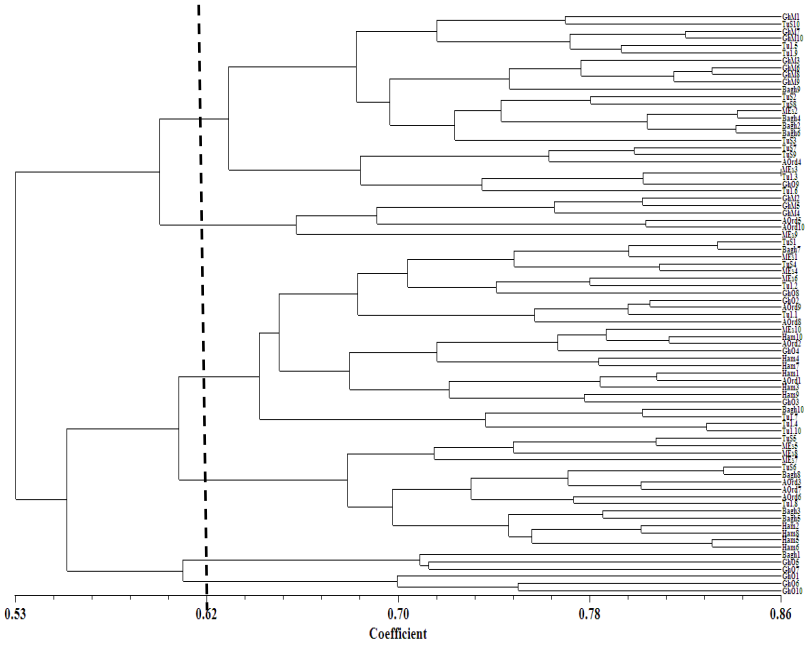


شکل ۳- نمودار دو بعدی روابط ژنتیکی بین ۸ جمعیت یونجه تتراپلوئید حاصل از تجزیه به مختصات اصلی (GhM: قره یونجه ملک کندی، TuS: ترکیه ساکوئل، Bagh: بغدادی، Tu1: ترکیه ۱، AOrd: آذربایجان اردوبار، MEs: محلی اصفهانی، Ham: همدانی و GhO: قره یونجه ارومیه)

اگر چه نشانگرهای ISSR تا حدودی جمعیت‌های مورد مطالعه را متمایز ساخت ولی میزان تمایز کلی بین جمعیت‌های مورد بررسی پایین بود (P =۰/۰۱ و PhiT = ۰/۰۸۹). تمایز پایین بین جمعیت‌ها در مطالعه حاضر احتمالاً به‌خاطر جریان ژنی و مهاجرت زیاد بین جمعیت‌ها می‌باشد. تمایز کم و مهاجرت و جریان ژنی زیاد بین جمعیت‌های یونجه تتراپلوئید ایران در مطالعات قبلی نیز گزارش شده است (۵، ۱۷). با توجه به وجود تنوع ژنتیکی بالای درون جمعیت‌ها، گروه‌های هتروتیک 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 (شکل٤) و هر کدام از گروه‌های اصلی نیز شامل دو زیر گروه بودند که می‌توانند معرف گروه‌های هتروتیک (جدول٤) باشند. کمترین تشابه ژنتیکی (۰/۵٤۳)، بین ژنوتیپ‌های قره یونجه ارومیه ۷ (GhO7) و قره یونجه ملک‌کندی ۲ (GhM2) و بیشترین تشابه ژنتیکی (۰/۸٦۳)، بین ژنوتیپ‌های محلی اصفهانی ۳ (MEs3) و ترکیه۳ (Tu1.3) مشاهده شد. میانگین تشابه ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها ۰/٦۹٦ بود. می‌توان از ژنوتیپ‌های مربوط به گروه‌های هتروتیک متفاوت به عنوان والدین تلاقی در برنامه‌های اصلاحی تولید هیبرید یا سمی هیبرید برتر بهره گرفت. البته فاصله ژنتیکی تنها عامل موثر در شناسایی والدین مناسب برای تولید هیبرید نیست و بایستی فاکتورهای دیگری مانند قابلیت ترکیب‌پذیری و فاصله ژنتیکی بر اساس صفات مورفولوژیک 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 نشانگرها، ناسازگاری افراد انتخاب شده جهت تلاقی و خطاهای مربوط به نشانگرهای ملکولی نسبت داد (۱۰، ۱۳). با این حال با کشف وجود رابطه بین فاصله ژنتیکی و عملکرد علوفه در یونجه تتراپلوئید (۳)، این امید پیدا شده است که نشانگرها 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 مورفولوژیک و استفاده از نشانگرهای مبتنی بر توالی ژن‌ها) می‌توان از جمعیت‌های مربوط به گروه‌های مختلف و ژنوتیپ‌های متعلق به گروه‌های هتروتیک متفاوت به عنوان والدین جهت تولید هیبرید، سمی هیبرید و ارقام سنتتیک در یونجه استفاده کرد. همچنین نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که تنوع ژنتیکی بالای درون جمعیت‌های یونجه مورد مطالعه، برای انجام برنامه‌های اصلاحی و دورگ‌گیری جهت افزایش عملکرد، کیفیت و سازگاری این گیاه مناسب می‌باشد و به نظر می رسد که روش ISSR به همراه روش‌های آماری چند متغیره مانند تجزیه کلاستر پتانسیل قابل توجهی جهت بررسی روابط خویشاوندی و تنوع ژنتیکی یونجه‌های تتراپلوئید را داراست. 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.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-11]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.4.8.2]



شکل ٤- دندروگرام ۸۰ ژنوتیپ یونجه تتراپلوئید به روش Complete linkage مبتنی بر ضرایب تشابه دایس حاصل از ١٦ آغازگر ISSR (GhM: قره یونجه ملک‌کندی، TuS: ترکیه ساکوئل، Bagh: بغدادی، Tu1: ترکیه ۱، AOrd: آذربایجان اردوبار، MEs: محلی اصفهانی، Ham: همدانی و GhO: قره یونجه ارومیه)

جدول ٤- گروه‌بندی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه یونجه زراعی در گروه‌های هتروتیک

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

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-11]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.4.8.2]

منابع

۱. رضایی م، نقوی م ر، معالی امیری ر (۱۳۸۹) ارزیابی تنوع ژنتیکی در اکوتیپهای یونجه زراعی (*Medicago sativa* L.) نواحی مرکزی و شرقی ایران با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره، مجله علوم زراعی ایران، ج ۱۲، ش ٤: ۵۳۲-۵۲۰

۲. فابریکی اورنگ ص، شمس بخش م، جلالی جواران م، احمدی ج (۱۳۸۸) بررسی تنوع ژنتیکی توده های بومی خربزه ایرانی با استفاده از نشانگرهای ملکولی بین ریزماهواره ای (ISSR)، مجله زیست شناسی ایران، ج ۲۲، ش ۲: ۱٦۷-۱۷۷.

۳. فرشادفر م، فارغی ش، فرشادفر ع، و جعفری ع ا (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، ش۱٦: ۱-۱۳.

٤. مانوسی ح، ولیزاده م، زهتاب سلماسی س، اهری زاد س، و سلوکی م (۱۳۸۹) بررسی تنوع ژنتیکی در ارقام بومی و سنتتیک یونجه با نشانگرهای پروتئینی بذر، مجله علوم گیاهان زراعی ایران، ش٤۱: 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 hetrosis 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) GenAlEx 6: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-11]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.4.8.2]

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.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-02-11]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.4.8.2]