"مجله علوم زراعی ایران"
جلد دوازدهم، شماره ۴ زمستان ۱۳۸۹

ارزیابی تنوع ژنتیکی در اکوتیپ‌های یونجه زراعی (*Medicago sativa* L.) نواحی مرکزی و شرقی ایران با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره

Assessment of genetic diversity in alfalfa (*Medicago sativa* L.) ecotypes from central and eastern regions of Iran using SSR markers

مهدی رضایی[۱]، محمد رضا نقوی[۲] و رضا معالی امیری[۳]

چکیده

رضایی،م.، م. ر. نقوی و ر. معالی امیری. 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. ۱۲ (۴) ۵۳۲-۵۲۰.**

در این آزمایش، ۳۳ توده یونجه زراعی از نواحی مرکزی و شرقی ایران با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره مورد ارزیابی قرار گرفتند. دی.ان.ای ژنومی استخراج شده از نمونه‌های گیاهی، با ۱۰ جفت آغازگر ریزماهواره، تحت واکنش زنجیره‌ای پلیمراز قرار گرفته و محصولات این واکنش‌ها روی ژل پلی اکریلامید واسرشته ساز، الکتروفورز شدند. در مجموع، ۶۲ نوار نمره‌دهی شده و ۵۲ نوار متفاوت با متوسط پنج نوار در هر لوکوس شناسایی شدند. درصد چند شکلی با میانگین ۸۰/۶۴ از ۶۲/۵ درصد برای آغازگر MTIC 250 **با کمترین درصد چند شکلی تا ۱۰۰درصد در آغازگر** ENOD 20 **با بیشترین درصد چند شکلی، متغیر بود. میانگین میزان اطلاعات چندشکلی** (PIC) **در توده‌های مرکز و شرق ایران، ۰/۶۱ محاسبه شد. نشانگر** ENOD20 **و** MAL369471 **بیشترین (۰/۷۸ و ۰/۸۳) و کمترین (۰/۳۷ و ۰/۳۴) مقدار** PIC **را به ترتیب، در دو جمعیت مرکز و شرق داشتند. تنوع ژنی نی** (H) **نیز در هر دو جمعیت مرکز و شرق به ترتیب ۰/۲۹ و ۰/۳ و شاخص اطلاعاتی شانون به ترتیب ۰/۴۵ و ۰/۴۶ محاسبه شدند. همچنین روابط ژنتیکی بین نمونه‌ها با استفاده از ضریب تشابه دایس محاسبه و دندروگرام حاصل با استفاده از روش** UPGMA **ترسیم گردید. نتایج این تحقیق نشان داد که با وجود شباهت بسیار زیاد بین دو جمعیت مرکز و شرق از نظر ساختار ژنتیکی، تنوع بسیار بالایی بین افراد وجود داشت. این تنوع زیاد ممکن است نتیجه دگرگشن بودن گیاه یونجه (۱۰ درصد خودگشنی)، فعالیت حشرات (به خصوص زنبورها) و انتقال دانه گرده بین ارقام باشد. تشابه ژنتیکی بین جمعیت‌های مورد مطالعه در این تحقیق، می‌تواند ناشی از تعادل ژنتیکی به وجود آمده طی صدها سال کشت یونجه در ایران و جابجایی بذرها بین مناطق مختلف ایران باشد.**

واژه های کلیدی: تنوع ژنتیکی، نشانگر ریزماهواره و یونجه زراعی

تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۶/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۱/۲۵

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران (مکاتبه کننده) (پست الکترونیک: m_rezaei_@yahoo.com)
۲- دانشیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
۳- استادیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2026-01-30]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1389.12.4.12.5]

مقدمه

افزایش تولید و بهبود کیفیت یونجه زراعی (*Medicago sativa*) به استفاده موثراز تنوع منابع و به کارگیری آنها در برنامه‌های اصلاحی نیاز دارد. نیل به این هدف مستلزم حفاظت، ارزیابی، ثبت و تبادل این مواد است (Abd-mishani *et al*, 1992). در بسیاری از منابع، مرکز تنوع و خاستگاه یونجه مناطقی از ایران ذکر شده است (Karimi, 1988). بنابراین، بررسی تنوع ژنتیکی یونجه در این نواحی می‌تواند در پیشبرد اهداف فوق‌الذکر، مهم باشد.

نشانگرهای مولکولی با انواع متعدد و مزایای بسیار، به عنوان یک ابزار تکمیلی، همراه نشانگرهای مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی در بررسی روابط فیلوژنتیکی گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرند، زیرا تحت تاثیر شرایط محیطی نبوده و در هر مرحله از رشد گیاه قابل استفاده هستند (Manifesto *et al*, 2001). بررسی تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت‌های یونجه زراعی می‌تواند خطرات احتمالی ناشی از فرسایش ژنتیکی را ارزیابی نموده و به توسعه حفاظت موثر از منابع ژنتیکی و در طراحی راهبرد بهبود ژنتیک، کمک کند (Peng *et al*, 2007). از جمله‌ی نشانگرهای مولکولی، نشانگرهای ریزماهواره یا توالی‌های ساده تکراری (Simple Sequence Repeat) هستند که در ژنوم موجودات به طور فراوان وجود دارند و به علت ماهیت هم بارزی، امتیازبندی آسان، محل ژنومی مشخص و تکرار پذیری بالا (Morgnate and Olivieri, 1993; Wang *et al*, 1994)، ابزار مناسبی برای تعیین سطح تنوع ژنتیکی، شناسایی و تفکیک ارقام، مدیریت مجموعه‌های ذخایر توارثی، نقشه یابی ژنتیکی و انتخاب به کمک نشانگر محسوب می‌شوند (Gupta and Varshney, 2000).

برای اولین بار چهار جایگاه ریزماهواره‌ای در یونجه به وسیله دیوان و همکاران (Diwan *et al*, 1997) جداسازی شدند. منگونی و همکاران (Mengoni *et al*, 2000) از این نشانگرها برای ارزیابی روابط ژنتیک بین اکوتیپ‌های زراعی یونجه استفاده کردند. ساندرین و همکاران (Sandrine *et al*, 2008) با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره تنوع ژنتیکی بین هفت رقم یونجه زراعی را بررسی و تنوع بالایی را در آنها گزارش نمودند. الوود و همکاران (Ellwood *et al*, 2006) شش توالی ساده تکراری را برای بررسی تنوع ژنتیکی نمونه‌های *M. truncatula*، مورد استفاده قرار دادند. برنادت و همکاران (Bernadette *et al*, 2003) ۸۷ آغازگر ریزماهواره را برای تعیین ساختار ژنتیکی و نقشه‌یابی در جمعیت‌های یونجه تتراپلوئید مورد استفاده قرار دادند. فلاحتی و همکاران (Falahati-Anbaran *et al*, 2005) در بررسی تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیتی شش جمعیت یونجه‌های زراعی (*M. sativa* L.) ایران توسط ۸ نشانگر SSR، نشان دادند که میزان تنوع درون جمعیت‌ها به مراتب بیشتر از تنوع بین جمعیت‌ها بوده، گیاهان درون جمیعت‌ها هتروزیگوسیتی بالائی داشته و جمعیت‌های مختلف ناهمگن یا هتروژن بودند. به نظر می‌رسد که نشانگرهای ریز ماهواره ابزار مولکولی قدرتمندی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی و توصیف ژرم‌پلاسم در یونجه‌های تتراپلوئید می‌باشند و در این آزمایش نیز از آنها در ارزیابی تنوع ژنتیکی یونجه‌های نواحی مرکز و شرق ایران استفاده شد. با توجه به این که امروزه واریته‌های مصنوعی در یونجه اهمیت زیادی پیدا کرده‌اند و بیشتر واریته‌های تجاری را تشکیل می‌دهند (Yadi-Samadi and Abd-Mishani, 1995) و تولید این واریته‌ها، مستلزم در اختیار داشتن توده‌هایی متنوع با خصوصیات مشخص می‌باشد، در این آزمایش ساختار جمعیت‌های مرکز و شرق ایران، میزان خلوص آنها و میزان جریان ژنی بین جمعیت‌ها با هدف بررسی امکان تولید ارقام ساختگی در یونجه‌های ایران، مورد ارزیابی قرار گرفت.

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2026-01-30]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1389.12.4.12.5]

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این تحقیق، ۳۳ توده یونجه زراعی که بذرهای آنها از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان تهیه شده بود، مورد ارزیابی قرار گرفتند (جدول ۱). بذرها در گلخانه پژوهشی گروه زراعت و اصلاح نباتات، واقع در پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج کشت شدند و پس از رشد گیاهچه‌ها، از هر گلدان ۵ گیاه به صورت تصادفی انتخاب و از برگ‌های سالم و جوان هر گیاه نمونه برداری صورت گرفت. برگ‌های جمع‌آوری شده پس از انجماد در نیتروژن مایع، به فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد منتقل شد. استخراج دی.ان.ای بر اساس روش سقایی معروف و همکاران با اندکی تغییر، صورت گرفت (Saghai-Maroof *et al,* 1984). آزمون تعیین کیفیت و کمیت دی.ان.ای روی ژل آگاروز ۰/۸ درصد و همچنین با استفاده از دستگاه نانودراپ انجام شد.

جدول ۱- شماره دسترسی توده‌های یونجه، محل جمع‌آوری، کد جغرافیایی و شماره افراد هر توده

Table 1. Accession number of alfalfa ecotypes, origin, geographical code and ecotypes number

شماره دسترسی[1] Accession Number[1]	محل جمع آوری Origin		کد[2] Code[2]	شماره دسترسی Accession Number	محل جمع آوری Origin		کد Code
44-1	Zarinshahr1	زرین شهر۱	C	268	Fezve3	فزوه ۳	C
23-1	Damghan	دامغان	C	11-1	Kahrizsang	کهریزسنگ	C
126-1	Fezve1	فزوه۱	C	126	Fezve4	فزوه۴	C
68	Zarinshahr2	زرین شهر۲	C	188	Rafsanjan	رفسنجان	E
42	Kohpaye1	کوهپایه۱	C	25	Sabzevar	سبزوار	E
47	Kashan1	کاشان۱	C	24	Yazd	یزد	E
9-2	Gorgan1	گرگان۱	C	145	Jiroft	جیرفت	E
39	Kohpaye2	کوهپایه۲	C	29	Gonaabad	گناباد	E
27	Shahrood	شاهرود	C	10-2	Neishabor	نیشابور	E
45	Golestankoh	گلستانکوه	C	34-2	Birjand 1	بیرجند۱	E
67	Gorgan2	گرگان۲	C	6	Sirjan	سیرجان	E
83	Falavarjan	فلاورجان	C	34-1	Birjand 2	بیرجند۲	E
30-2	Varamin	ورامین	C	36-1	Shahrebabak	شهر بابک	E
147-1	Fezve2	فزوه۲	C	4	Sistan	سیستان و بلوچستان	E
8	Esfahan	اصفهان	C	32	Torbat	تربت	E
14-2	Kashan2	کاشان۲	C	56-2	Bam	بم	E
5	Meyme	میمه	C				

۱- بذر اکوتیپ‌ها با کدهای ارائه شده در جدول از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی اصفهان قابل دسترس می‌باشد

1-The ecotypes seed are accessible from Agricultural and Natural Recourses Center of Esfahan

۲ -کد توده‌ها بر اساس طول جغرافیایی منطقه جمع‌آوری. C برای نمونه‌های مرکز و E برای نمونه‌های شرق ایران

2-Ecotypes code, based on origins longitude. (C=Center, E=East)

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

ده نشانگر ریزماهواره موجود در منابع اطلاعاتی برای انجام این بررسی استخراج و مورد استفاده قرارگرفت (جدول ۲) (Bernadette *et al*, 2003, Diwan *et al,* 2000). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، در حجم ۱۵ میکرولیتر با غلظت نهایی بافر یک برابر، دو میلی مولار کلرور منیزیم ، یک واحد تک دی.ان.ای پلیمراز، ۰/۶۷ پیکو مول از هر آغازگر، ۰/۶۷ میلی مول مخلوط، dNTP، ۵۰ نانوگرم دی.ان.ای ژنومی و ۷/۱ میکرولیتر آب مقطر دو بار استریل،

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2026-01-30]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1389.12.4.12.5]

جدول ۲- نام و توالی آغازگرهای مورد استفاده و اطلاعات چندشکلی آغازگرها

Table 2. Name and sequences of primers and polymorphic information of primers

نام آغازگر Primer name		توالی آغازگرها (L=Left,R=Right) Primers sequences	تعداد باند Number of bands	تعداد باند چند شکل Number of polymorphic bands	درصد چند شکلی Percentage of polymorphism	شاخص نشانگر Marker index
MTIC345	L R	5’-tccgatcttgcgtcctaact-3’ 5’-ccattgcggtggctactct-3’	5	4	80	2.8
B21E13	L R	5’-gccgatggtactaatgtagg-3’ 5’-aaatcttgcttgcttctcag-3’	6	4	66	2.18
MTIC332	L R	5’-ccctgggtttttgatccag-3’ 5’-ggtcatacgagctcctccat-3’	6	5	83	3.62
B14B03	L R	5’-gcttgttcttcttcaagctc-3’ 5’-acctgacttgtgttttatgc-3’	6	5	85.7	3.5
MTIC432	L R	5’-tggaatttgggatataggaa-3’ 5’-ggccataagaacttccactt-3’	5	4	80	2.68
FMT13	L R	5’-gatgagaaaatgaaaagaac-3’ 5’-caaaaactcactctaacacac-3’	7	6	85.7	3.04
AFct45	L R	5’-taaaaaacggaaagagttggttag-3’ 5’- gccatcttttcttttgcttc-3’	8	7	87.5	4.58
MAL369471	L R	5’-attcacacaaacccatcttc-3’ 5’-aaacccttagcaccgaca-3’	4	3	75	1.08
ENOD20	L R	5’-cgaacttcgaattaccaaagtct-3’ 5’-ttgagtagcttttgggttgtc-3’	7	7	100	5.66
MTIC250	L R	5’-gcctgaactattgtgaatgg-3’ 5’-cgttgatgatgttcttgatg-3’	8	5	62.5	2.87
Average میانگین			6.2	5.2	80.64	3.2

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2026-01-30]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1389.12.4.12.5]

انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در دستگاه ترمو سایکلر (Bio Rad, USA) با برنامه زمانی چهار دقیقه واسرشته سازی اولیه در ۹۴ درجه سانتیگراد، ۱۰ چرخه اولیه به صورت Touchdown (به طوری که دمای اتصال را پنج درجه بالاتر از دمای ذوب آغازگر در نظر گرفته و در هر چرخه یک درجه از دما کاسته می‌شود تا به پنج درجه زیر دمای ذوب آغازگر برسد) و ۲۵ چرخه شامل ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه، ۳۰ ثانیه در ۵۵ درجه و یک دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد انجام شد. بسط نهایی در ۷۲ درجه به مدت پنج دقیقه انجام شد. فرآورده‌ی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با پنج میکرولیتر رنگ فرمامید ۹۸ درصد مخلوط و قبل از بارگذاری به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه واسرشته و سپس بلافاصله به توده یخ منتقل شدند. ده میکرولیتر از مخلوط فرآورده واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و رنگ فرمامید، بر روی ژل پلی‌اکریلامید واسرشته ساز استاندارد شش درصد (در دستگاه Bio Rad, squi-Gen GT , USA) بارگذاری و الکتروفورز با توان ثابت ۹۰ وات به مدت ۶۰ تا ۹۰ دقیقه (بسته به طول جایگاه‌ها) انجام و سپس رنگ آمیزی ژل با استفاده از روش نیترات نقره انجام شد (Bassam *et al*, 1991).

تجزیه وتحلیل داده‌ها

امتیازدهی نوارها، به صورت یک برای وجود نوار و صفر برای عدم وجود نوار، صورت گرفت. توده‌های موجود، بر اساس طول جغرافیایی به دو گروه [گروه مرکز کد C (با طول جغرافیایی ۵۶-۵۰ درجه) و به گروه شرق کد E (با طول جغرافیایی ۶۲-۵۶ درجه)] تقسیم شدند. میزان اطلاعات چند شکلی (PIC) (Polymorphic Information Content) بر اساس فرمول

$$PIC = 1 - \sum_{I=1}^{N} P_I^{\,2} \qquad (۱)$$

(Prasad *et al*, 2000) و همچنین شاخص نشانگر (Marker Index) با استفاده از فرمول

$$MI = PIC.N.\beta \qquad (۲)$$

برای کلیه آغازگرها محاسبه شد که PIC میانگین میزان اطلاعات چند شکلی برای هر جفت آغازگر، N تعداد کل باندها برای هر جفت آغازگر و β درصد چند شکلی (تعداد جایگاه‌های چندشکل تقسیم بر تعداد کل جایگاه‌ها) برای هر جفت آغازگر می‌باشد. این شاخص علاوه بر مزایای شاخص PIC تعداد کل نوار و نسبت چند شکلی را نیز در نظر گرفته و پتانسیل هر آغازگر را جهت تولید نوار بیشتر نشان می‌دهد (Anderson *et al*, 1993, Powell, *et al* 1996). پارامترهای مربوط به ساختار ژنتیکی بین (H_T، H_S، G_{ST} و N_M) و درون زیرجمعیت‌ها (N_a، N_e، H و I) با استفاده از نرم افزار POPGENE32 محاسبه شدند (جدول‌های ۴ و۵) (Yeh, 1999). بررسی روابط ژنتیک بین نمونه‌ها بر اساس تجزیه به مختصات اصلی با استفاده از نرم افزار DARwin 5 انجام شد (شکل ۱). روابط ژنتیکی بین نمونه‌ها با استفاده از ضریب تشابه دایس محاسبه و دندروگرام مربوطه با استفاده از روش UPGMA ترسیم شد.

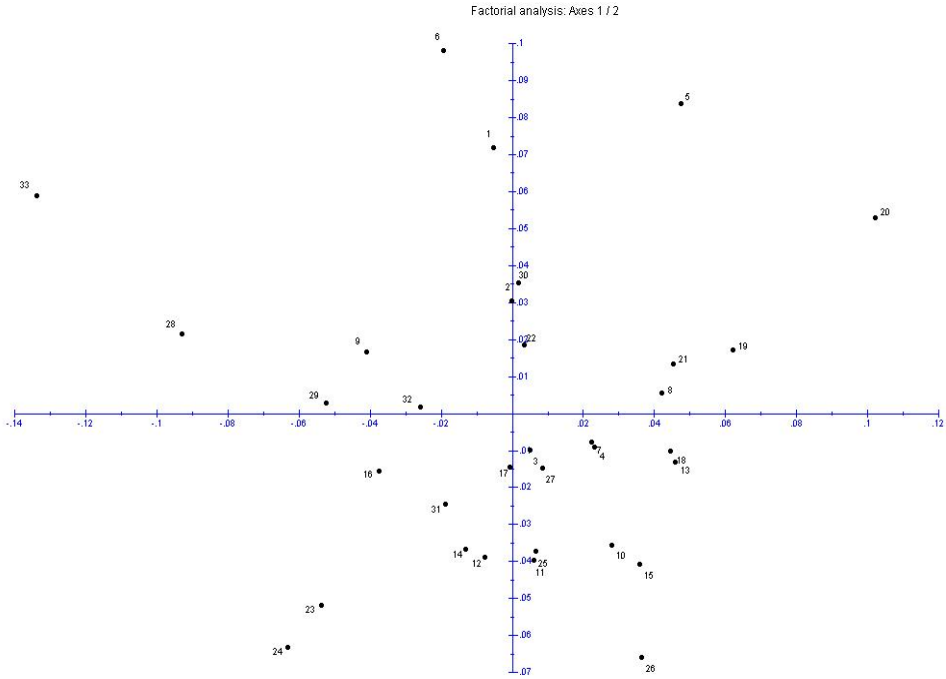
نتایج و بحث

اطلاعات چندشکلی

تمامی ده جفت آغازگر ریزماهواره به کار رفته در این آزمایش چند شکلی داشتند و در مجموع ۶۲ نوار نمره‌دهی شد که ۵۲ نوار چند شکل بودند. تعداد نوارهای چند شکل از ۳ تا ۷ نوار برای هر آغازگر متغیر بود. بیشترین نوار چند شکل مربوط به جفت آغازگرهای AFct 45 و ENOD 20 با ۷ نوار و کمترین نوار چند شکل مربوط به جفت آغازگر MAL369471 با ۳ نوار بود. میانگین ۶/۲ نوار و ۵/۲ نوار چند شکل برای همه آغازگرها حاصل شد (جدول ۲). درصد چند شکلی از ۶۲/۵ درصد برای آغازگر MTIC 250 با کمترین درصد چند شکلی تا ۱۰۰درصد برای آغازگر ENOD 20 با بیشترین درصد چند شکلی، متغیر بود و میانگین میزان چند شکلی، ۸۰/۶۴ درصد محاسبه شد (جدول ۲). فلاحتی و همکاران (Falahati-Anbaran *et al*, 2005) تنوع ژنتیکی درون و

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2026-01-30]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1389.12.4.12.5]



شکل ۱- نمودار دو بعدی مربوط پراکندگی اکوتیپ‌های یونجه با استفاده از آزمون تجزیه به مختصات اصلی

Fig. 1. Two dimentional diagram related to alfalfa ecotypes diversity using factorial analysis

بین جمعیتی را در شش جمعیت یونجه زراعی توسط هشت نشانگر ریزماهواره مورد بررسی قرار دادند و ۶۶ نوار چندشکل با میانگین ۲/۲۶ نوار چندشکل، بدست آوردند.

میزان اطلاعات چندشکلی (PIC) برای هر جفت آغازگر، به طور جداگانه برای کل توده‌ها و توده‌های مرکز و شرق ایران محاسبه شد و میانگین این شاخص برای کل توده‌ها ۰/۶۲ و توده‌های مرکز و شرق ایران به ترتیب ۰/۶۲ و ۰/۶۱ محاسبه شد (جدول ۳). نشانگر ENOD20 دارای بیشترین مقدار PIC برای هر دو جمعیت مرکز و شرق (به ترتیب ۰/۷۸ و ۰/۸۳) و نشانگر MAL369471 دارای کمترین مقدار PIC برای هر دو جمعیت مرکز و شرق (به ترتیب ۰/۳۷ و ۰/۳۴) بود. بنابراین نشانگر ENOD20 با بیشترین مقدار PIC، بهتر از سایر نشانگرهای به کار رفته توانست فاصله ژنتیکی نمونه‌ها را مشخص کند. بر اساس نتایج برخی آزمایش‌ها، میزان PIC متفاوت بوده و نمی‌تواند عدد ثابتی داشته باشد (Roder *et al*, 1998). میزان PIC به عواملی مانند تعداد آلل هر جایگاه، محتوای نوکلئوتیدهای G و T در نواحی تکرار شونده (که همبستگی مثبتی با میزان چندشکلی دارد) و طول توالی تکراری وابسته است (Roder *et al*, 1998). تعداد ژنوتیپ‌ها و تعداد آغازگرهای ریزماهواره نیز با محتوای چند شکلی همبستگی مثبت دارد (Prasad *et al*, 2000). محاسبه شاخص نشانگر (MI) برای هر کدام از نشانگرهای مورد استفاده (جدول ۲)، نشان داد که بیشترین میزان شاخص نشانگر مربوط به آغازگر ENOD20 (۵/۶۶) و کمترین مقدار مربوط به آغازگر MAL369471 (۱/۰۸) بود و میانگین این شاخص ۳/۲ محاسبه شد. این شاخص پتانسیل هر آغازگر در تولید نوار بیشتر را نشان می‌دهد (Anderson *et al*, 1993 و Powell *et al*, 1996).

تنوع ژنتیکی درون زیرجمعیت‌ها

میانگین شاخص‌های درون جمعیتی شامل آلل‌های

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2026-01-30]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1389.12.4.12.5]

جدول ۳- محتوای چند شکلی نشانگرها (PIC) در جمعیت نهایی و زیر جمعیت‌های یونجه شرق و مرکز

Table 3. Polymorphism Information Content (PIC) of total population and subpopulations of alfalfa

نام آغازگر Primer name	PIC کل جمعیت Total Population PIC	PIC زیرجمعیت مرکز(C) PIC of Central subpopulation	PIC زیرجمعیت شرق(E) PIC of eastern subpopulation
MTIC345	0.7	0.67	0.72
B21E13	0.55	0.55	0.51
MTIC332	0.72	0.72	0.72
B14B03	0.68	0.64	0.71
MTIC432	0.67	0.66	0.65
FMT13	0.5	0.53	0.42
AFct45	0.65	0.66	0.63
MAL369471	0.36	0.37	0.34
ENOD20	0.81	0.78	0.83
MTIC250	0.57	0.58	0.55
PIC میانگین Average of PIC	0.62	0.61	0.61

مشاهده شده (Na)، تعداد آلل‌های موثر (Ne)، تنوع ژنی نی (H) و شاخص اطلاعاتی شانون (I) برای کل جمعیت و زیرجمعیت‌های مرکز و شرق به تفکیک در جدول ۴ ارائه شده است. میانگین آلل‌های مشاهده شده برای کل جمعیت و زیرجمعیت‌های مرکز و شرق مساوی و برابر ۱/۹۶ و میانگین تعداد آلل‌های موثر در زیرجمعیت مرکز ۱/۴۸ و در زیرجمعیت شرق ایران ۱/۴۹ محاسبه شد. تنوع ژنی نی (H) نیز در هر دو زیرجمعیت مرکز و شرق به ترتیب ۰/۲۹ و ۰/۳ و شاخص اطلاعاتی شانون به ترتیب ۰/۴۵ و ۰/۴۶ محاسبه شد. نتایج نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری بین شاخص‌های محاسبه شده در هر دو زیرجمعیت، وجود نداشته و هر دو زیرجمعیت، با وجود اختلاف در تعداد اعضای آنها (مرکز ۱۰۰ گیاه و شرق ۶۵ گیاه) ساختار ژنتیکی یکسانی داشتند.

جدول ۴- شاخص‌های اندازه گیری شده در مورد تنوع ژنتیکی کل جمعیت و درون زیرجمعیت‌های یونجه

Table 4. Calculated indices related to genetic diversity within subpopulations of alfalfa.

شاخص Statistic	کل جمعیت Total population	زیرجمعیت مرکز (C) Central population	زیرجمعیت شرق (E) Eastern population
Na(st.d)	1.96 ±0.19	1.96±0/19	1.96±0/19
Ne(st.d)	1.49±0.3	1.48±0.3	1.49±0.31
H(st.d)	0.3 ±0.14	0.29 ±0.14	0.3 ±0.15
I(st.d)	0/46±0.18	0/45±0.19	0/46±0.19

Na= تعداد آلل مشاهده شده، Ne= تعداد آلل‌های مؤثر، H= تنوع ژنتیکی نی، I= شاخص اطلاعاتی شانون

Na= Observed number of alleles, Ne= Efficient number of alleles, H= Neis gene diversity, I= Shannons information index

تنوع ژنتیکی بین زیرجمعیت‌ها و اکوتیپ‌ها

جهت بررسی روابط بین زیرجمعیت‌های مربوط به مرکز و شرق ایران، شاخص‌های بین جمعیتی محاسبه شدند (جدول ۵). اولین شاخص، میانگین تنوع ژنتیک نهایی (H_T) با ۱۶۵ فرد، ۰/۳ برآورد شد. شاخص متوسط تنوع ژنی در داخل زیر جمعیت‌ها (H_S)، ۰/۳ محاسبه شد. مقدار تنوع ژنی در جمعیت نهایی، حاصل جمع تنوع ژنی در داخل زیرجمعیت‌ها و تنوع ژنی بین زیرجمعیت‌ها می‌باشد (Nei, 1973). نتایج نشان داد که مقدار تنوع ژنی در جمعیت نهایی با متوسط تنوع ژنی در داخل زیرجمعیت‌ها مساوی و مقدار تنوع ژنی بین زیرجمعیت‌ها تقریبا صفر بوده و هر دو زیرجمعیت

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2026-01-30]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1389.12.4.12.5]

ساختار یکسانی داشتند. ضریب تمایز ژنی بین جمعیت‌ها (G_{ST}) ۰/۰۱ و جریان ژنی (N_M)، ۴۴/۵۶ محاسبه شد. آماره G_{ST} نشان داد که تنها یک درصد از تنوع مشاهده شده در جمعیت نهایی ناشی از تنوع بین زیرجمعیت‌ها است و ۹۹ درصد تنوع در جمعیت نهایی ناشی از تنوع بین افراد بوده است. مقدار جریان ژنی متاثر از ضریب تمایز ژنی بین جمعیت‌ها بوده و همبستگی منفی با آن دارد.

جهت بررسی روابط بین اکوتیپ‌ها شاخص‌های بین جمعیتی محاسبه شدند (جدول ۶) و نتایج نشان داد که بیش از ۷۰ درصد تنوع نهایی در اکوتیپ‌ها حاصل تنوع در درون اکوتیپ‌ها بود و در واقع تنوع کمی بین اکوتیپ‌ها وجود داشت. این موضوع نشان می دهد که اکثر تنوع محاسبه شده حاصل تنوع میان افراد درون اکوتیپ‌ها بوده و اکوتیپ‌ها تفاوت کمی با یکدیگر داشتند. در آزمایش فلاحتی و همکاران (Falahati-Anbaran *et al*, 2005) نیز نتایج مشابهی به دست آمد. نتایج این گروه نشان داد که میزان تنوع درون جمعیت‌ها به مراتب بیشتر از تنوع بین جمعیت‌ها بوده، به طوری که گیاهان درون جمعیت‌ها هتروزیگوسیتی بالایی داشته و جمعیت‌های مختلف ناهمگن بودند.

جدول ۵- شاخص‌های اندازه گیری شده در مورد تنوع بین زیر جمعیت‌های یونجه

Table 5. Calculated indexes related to genetic diversity between subpopulations of alfalfa

شاخص Statistic	مقدار محاسبه شده (St.d) Calculated Value (St.d)
H_T	0.3037±0.02
H_S	0.3004±0.02
G_{ST}	0.01
N_M	44.56

HT= تنوع ژنتیکی نهایی، HS= تنوع ژنتیکی داخل زیرجمعیت‌ها (مرکز و شرق)، GST= ضریب تمایز ژنی و NM= جریان ژنی

HT= Total genetic diversity, HS= Genetic diversity within subpopulations, GST= Gene differentiation coefficient, NM= Gene flow

جدول ۶- شاخص‌های اندازه گیری شده در مورد تنوع بین اکوتیپ‌های یونجه

Table 6- Calculated indices related to genetic diversity between ecotypes of alfalfa

شاخص Statistic	مقدار محاسبه شده (St.d) Calculated Value (St.d)
H_T	0.3197±0.02
H_S	0.2341±0.01
G_{ST}	0.267
N_M	1.36

HT= تنوع ژنتیکی نهایی، HS= تنوع ژنتیکی درون اکوتیپ‌ها، GST= ضریب تمایز ژنی و NM= جریان ژنی

HT= Total genetic diversity, HS= Genetic diversity within ecotypes, GST= Gene differentiation coefficient, NM= Gene flow

تجزیه به مختصات اصلی

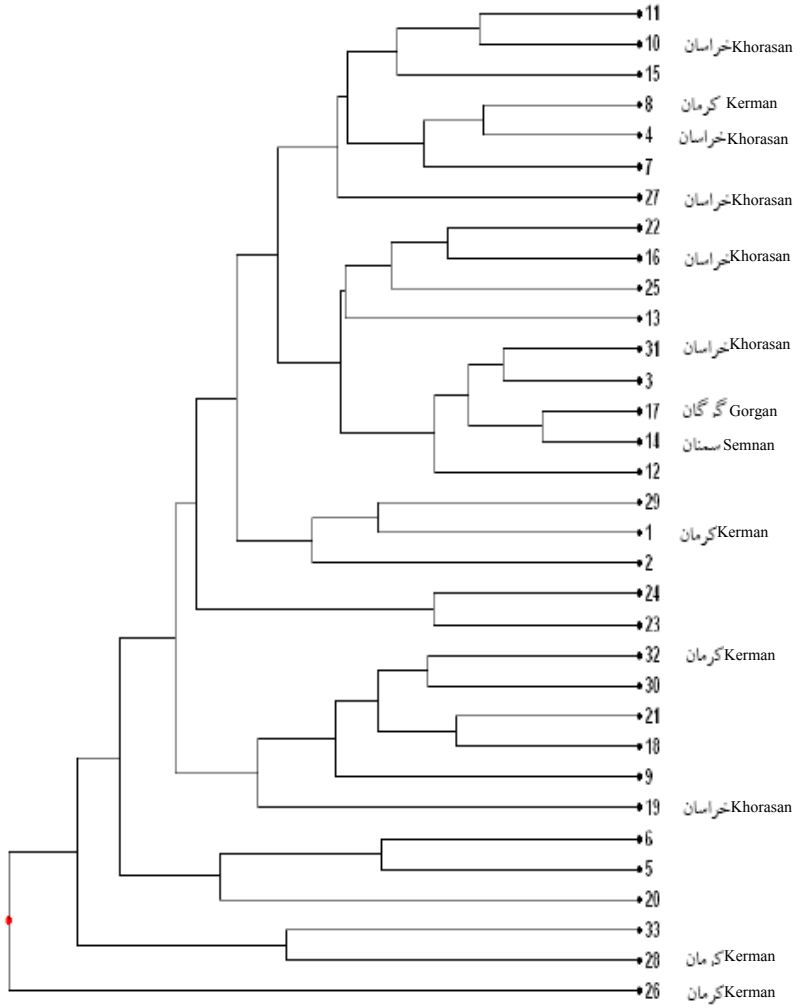
بررسی روابط ژنتیک بین اکوتیپ‌ها با استفاده از ضریب تشابه دایس و آزمون تجزیه به مختصات اصلی، انجام شد (شکل ۱). نمودار دو بعدی نشان داد که پراکندگی بسیار زیادی در اکوتیپ‌ها وجود داشته و اکوتیپ‌ها در هر چهار ناحیه‌ی نمودار پراکنده هستند. دندروگرام حاصل از روش UPGMA نیز مؤید پراکندگی زیاد اکوتیپ‌ها می‌باشد (شکل ۲). در آزمایش حاضر ۶ و ۵ اکوتیپ به ترتیب از نقاط مختلف استان‌های خراسان و کرمان جمع‌آوری شدند و همانطور که دندروگرام نشان می‌دهد، اکوتیپ‌های متعلق به یک استان در نقاط مختلف پراکنده هستند. همچنین نزدیک

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2026-01-30]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1389.12.4.12.5]

ترین اکوتیپ‌ها در دندروگرام (شماره‌های ۱۴ و ۱۷) متعلق به دو استان مختلف (سمنان و گرگان) بودند . این نتایج نشان می‌دهد که همپوشانی مناسبی بین داده‌های مولکولی و مناطق جغرافیایی وجود ندارد. شاه نجات بوشهری و همکاران (Shah-Nejat Bushehri *et al*, 2008) در ارزیابی ۲۱ جمعیت ایرانی و هفت رقم خارجی یونجه زراعی با نشانگر RAPD نشان دادند که در اثر تشابه ژنتیک بالا، میزان تنوع ژنتیک بین ارقام پایین بوده و دندروگرام حاصل از داده‌های مولکولی، همپوشانی خوبی با نواحی جغرافیایی نداشت. آن ها گزارش کردند که عدم انطباق داده‌های مولکولی و مناطق جغرافیایی امری مرسوم در یونجه‌های کشور می‌باشد. این موضوع ممکن است ناشی از پدیده جریان ژن بین جمعیت‌ها و دگرگشن بودن جمعیت‌های یونجه زراعی باشد.

نتایج به دست آمده در این آزمایش نشان می‌دهد که با وجود شباهت بسیار زیاد دو جمعیت مرکز و شرق



شکل ۲- دندروگرام ترسیم شده با روش UPGMA جهت بررسی انطباق داده‌های مولکولی و مناطق جغرافیایی پراکنش یونجه

Fig. 2. Depicted dendrogram using UPGMA method for study on consistency of molecular data and geographical location of alfalfa

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2026-01-30]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1389.12.4.12.5]

از نظر ساختار ژنتیک، تنوع بسیار بالایی بین افراد وجود دارد. این تنوع زیاد ممکن است نتیجه‌ی دگرگشن بودن گیاه یونجه (۱۰ درصد خودگشنی)، فعالیت حشرات (به خصوص زنبورها) و انتقال دانه گرده بین انواع یونجه باشد. نتایج بررسی تنوع ژنتیکی بین اکوتیپ‌ها نشان داد که بیش از ۷۰ درصد تنوع ژنتیکی نهایی، حاصل تنوع ژنتیکی درون اکوتیپ‌ها بوده و تنوع ژنتیکی بین اکوتیپ‌ها پایین بوده است. با توجه به اینکه یونجه بومی ایران بوده و دارای سابقه زیادی از نظر کشت و کار در ایران است، جابجایی بذرها بین مناطق مختلف بدیهی و مورد انتظار می‌باشد. تشابه ژنتیک جمعیت‌های مورد مطالعه در این تحقیق می‌تواند ناشی از تعادل ژنتیک به وجود آمده طی سال‌ها کشت یونجه و جابجایی بذرها بین مناطق مختلف ایران باشد.

نتایج به دست آمده نشان داد که اکوتیپ‌های موجود در ایران در اثر جریان ژنی بالا و اختلاط بذرها به صورت مخلوطی از ژنوتیپ‌ها هستند و استفاده از آنها در تولید ارقام ساختگی امکان پذیر نمی‌باشد. با توجه به اینکه یونجه بومی ایران بوده و به تبع آن تنوع و صفات با ارزشی در یونجه‌های ایران وجود دارد، تهیه و تدوین راهبردهایی جهت خالص نمودن یونجه‌های ایران و استفاده از آنها در ایجاد ارقام ساختگی و روش‌های اصلاحی دیگر، ضروری می‌باشد. برای رسیدن به این هدف پیشنهاد می‌شود که دستور العمل‌هایی (Descriptor) بر اساس صفات ریخت شناسی و کیفی یونجه‌ها طراحی شده و یونجه‌های مناطق مختلف کشور، بر اساس این دستورالعمل از یکدیگر تفکیک و خالص سازی شوند تا بتوان از آنها در برنامه‌های اصلاحی و تولید ارقام اصلاح شده و سازگار با شرایط مختلف بهره‌گیری نمود.

سپاسگزاری

هزینه این تحقیق توسط وزارت جهاد کشاورزی دفتر محصولات علوفه ای در قالب طرح ۴۰۵ با دانشگاه تهران پرداخت شده است که بدینوسیله تشکر می‌شود.

منابع مورد استفاده

References

Abd-Mishani, S. and A. A.Shah Nejat. Bushehri. 1992. Advanced Plant Breeding. Tehran University Press. (In Persian).

Anderson, J. A., J. E. Church, S. D. Autrique, S. Thanksley and M. E. Sorrells. 1993. Optimizing parental selection for genetic linkage map. Genome 36(1) 181-188.

Bassam, B., J. G. Caetano-Anolles and P. M. Gressho. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 19: 680-683.

Bernadette, J., V. Sandrine, B. Philippe, C. Gaelle, S. Sylvain, H. Thierry and H. Christian. 2003. Construction of two genetic linkage maps in cultivated tetraploid alfalfa (*Medicago sativa*) using microsatellite and AFLP markers. BMC Plant Biol. 3:1-19.

Diwan, N., A. A. Bhagwat, G. B. Bauchan and P. B. Cregan, 1997. Simple sequence repeat DNA markers in alfalfa and perennial and annual *Medicago* species. Genome 40: 887-895.

Diwan, N., J. H. Bonton, G. Kochert, and P. B. Cregan. 2000. Mapping of simple sequence repeat (SSR) DNA markers in diploid and tetraploid alfalfa. Theor. Appl. Genet. 101: 165-172.

Ellwood, S. E., N. K. D.Souza, L. G. Kamphuis, T. I. Burgess, R. M. Nair and R. P. Oliver. 2006. SSR analysis

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2026-01-30]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1389.12.4.12.5]

of the *Medicago truncatula* SARDI core collection reveals substantial diversity and unusual genotype dispersal throughout the Mediterranean basin. Theor. Appl. Genet. 112: 977–983.

Falahati-Anbaran. M, A. A. Habashi, M. Esfahani, S. A. Mohammadi and B. Ghareyazie. 2005. Evaluating of genetic structure and genetic diversity within and between Iranian alfalfa (*Medicago sativa*) populations using SSR. Iran. J. Agric. Sci. 36: 979-989. (In Persian with English abstract).

Gupta, P. K. and R. K. Varshney. 2000. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. Euphytica. 113: 163-185.

Karimi, H. 1988. Cultivation and Breeding of Forage Crops. Tehran University Press. Pp332. (In Persian).

Manifesto, M. M., A. S. Schlatter, H. E. Hopp, E. Y. Suarez and J. Dubcovky. 2001. Quantitative evaluation of genetic diversity germplasm using molecular markers. Crop. Sci. 41: 682-690.

Mengoni, A., A. Gori and M. Bazzicalupa. 2000. Use of RAPD and microsatellite (SSR) variation to assess genetic relationships among papulations of tetraploid alfalfa, *Medicago sativa*. Plant Breed. 119: 311-317.

Morgnate, M. and A. M. Olivieri. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. Planta 3: 175-182.

Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 70: 3321-3323.

Peng L. Z., L. S. Gong and C. Y. Qing. 2007. A novel statistical method for assessing SSR variation in autotetraploid alfalfa (*Medicago sativa* L.). Genet. Mol. Biol. 30: 385-391.

Powell, W., M. Morgante, C. Ander, M. Hanafey, J. Vogel, S. Tingy, and A. Rafalaski, 1996. The comparision of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) marker for germplasm analysis. Mol. Breed. 2: 225-238.

Prasad, M., R. K. Varsheny, J. K. Roy, H. S. Balyan, and P. K. Gupta. 2000. The use of microsatellite for detection DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity in wheat. Theor. Appl. Genet. 100: 584-592.

Roder, M. S., V. Korzun, K. Wendehake, J. Plaschke, M. H. Tixier, P. Leroy and M. W. Ganal. 1998. A microsatellite map of wheat. Genetics 149: 2007-2023.

Saghai-Maroof, M. A., K. M. Soliman, R. A. Jorgensen and R. W. Allard. 1984. Ribosomal spacer length polymorphism in barley: mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 83: 1757-1761.

Sandrine, F., R. Joëlle, B. Pierre, B. Philippe, H. Thierry, H. Christian and J. Bernadette. 2008. Genetic diversity among alfalfa (*Medicago sativa*) cultivars coming from a breeding program, using SSR markers. Theor. Appl. Genet. 111: 1420-1429.

Shah-Nejat Bushehri, A. A., H. A. Fattahi and B. Yazdi-Samadi. 2008. Evaluating of genetic diversity of commonly grown Iranian alfalfa cultivars (*Medicago sativa*) using RAPD markers. J. Modern Genet. 3: 35-43.

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2026-01-30]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1389.12.4.12.5]

Wang, Z., J. L. Weber, G. Zhang and S. D. Tanksley. 1994. Survey of plant short tandem DNA repeats. Theor. Appl. Genet. 88: 1-6.

Yazdi-Samadi, B. and C. Abd-Mishani. 1995. Breeding Field Crops. Tehran University Press. (In Persian).

Yeh, F. C., R. C. Yang, T. Boyle. 1999. POPGENE, the User-friendly Shareware for Population Genetic Analysis. Molecular Biology and Biotechnology Center, Unerversity of Alberta, Canada. http://www.ulberta.ca/fyeh/

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2026-01-30]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1389.12.4.12.5]

Assessment of genetic diversity in alfalfa (*Medicago sativa* L.) ecotypes from central and eastern regions of Iran using SSR markers

Rezaie, M[1]., M. R. Naghavi[2] and R. Maali-Amiri[3]

ABSTRACT

Rezaie, M., M. R. Naghavi and R. Maali-Amiri. 2010. Assessment of genetic diversity in alfalfa (*Medicago sativa* L.) ecotypes from central and eastern regions of Iran usingSSR markers. **Iranian Journal of Crop Sciences. 12 (4): 520-532. (In Persian)**

Genetic variation in 33 alfalfa ecotypes from central and eastern regions of Iran was assessed using SSR markers. PCR analysis was performed on genomic DNA using 10 microsatellite primer pairs. PCR products were detected using denatured polyacrylamide gel. From 62 reproducible bands identified, 52 bands were polymorphic corresponding to an average of 5 bands per locus. The proportion of polymorphism with an average of 80.64% varied from 62.5 for MTIC250 to 100 for ENOD 20. The average of polymorphism information content (PIC) was 0.61. ENOD20 and MAL369471 primers had the highest PIC value (0.78 and 0.83) and the lowest one (0.37 and 0.34) in central and eastern ecotypes, respectively. Nei's gene diversity and Shannon's information index for both of populations were calculated and their values were 0.29, 0.3 and 0.45, 0.46, respectively. Genetic similarity was estimated using the Dice coefficient, and dendrogram was constructed using the UPGMA method. Generally, results showed that despite of the similarities of genetic structures between the ecotypes from two regions, high variation was observed among individual plants possibly due to the high allogamy (90%), insects activity (particularly bees) and pollen transmission among ecotypes. Genetic similarity between ecotypes in this study could be considered as consequeneces of genetic equilibrium that have been occurred over long time of cultivation of alfalfa in these regions as well as seed exchange among provinces.

Key words: Alfalfa, Genetic variation and Microsatellite marker

Received: September, 2009 Accepted: April, 2010

1- MSc Student, The University of Tehran, Karaj, Iran (Corresponding author) (Email: m_rezaei_@yahoo.com)
2- Associate Prof., The University of Tehran, Karaj, Iran
3- Assistant Prof., The University of Tehran, Karaj, Iran

[Downloaded from agrobreedjournal.ir on 2026-01-30]

[DOR: 20.1001.1.15625540.1389.12.4.12.5]