

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

مهدى رضابي^۱، محمد رضا نقوى^۲ و رضا معالى اميرى^۳

چكیده

رضابي، م. د. نقوى و ر. معالى اميرى. ۱۳۸۹. ارزیابی تنوع ژنتیکی در اکوتوپ‌های 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.ا.ی 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 و اسروشه 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 ۶۲/۵ از ۶۰/۶۴ درصد برای آغازگر MTIC 250 با کمترین درصد چند شکلی تا ۱۰۰ درصد در آغازگر 20 ENOD با بیشترین درصد چند شکلی، متغیر بود. میانگین میزان اطلاعات چندشکلی (PIC) در توده‌های مرکز و شرق ایران، ۰/۶۱ ENOD20 و ۰/۶۰ 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 (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 و ۰/۴۰ محاسبه شدند. همچنین روابط ژنتیکی بین نمونه‌ها با استفاده از ضربیت 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 خودگشنسی)، 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.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، نشانگر ریزماهواره و یونجه زراعی

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

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد پرديس كشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران (مکاتبه كننده) (پست الكترونيك: (m_rezaei_@yahoo.com
- ۲- دانشیار پرديس كشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
- ۳- استادیار پرديس كشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

همکاران (Mengoni *et al.*, 2000) از این نشانگرها برای ارزیابی روابط ژنتیک بین اکو-تیپ‌های زراعی یونجه استفاده کردند. ساندرین و همکاران (Sandrine *et al.*, 2008) با استفاده از نشانگرها ریزماهواره تنوع ژنتیکی بین هفت رقم یونجه زراعی را بررسی و تنوع بالایی را در آنها گزارش نمودند. الود و همکاران (Ellwood *et al.*, 2006) شش توالی مونوهای *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 تراپلولئید 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 جمعیت‌ها هتروزیگوستی بالائی داشته و جمعیت‌های مختلف ناهمگن یا هتروژن بودند. به نظر می‌رسد که نشانگرها ریزماهواره ابزار مولکولی قدرتمندی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی و توصیف ژرم‌پلاسم در یونجه‌های تراپلولئید می‌باشد 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.

مقدمه

افزایش تولید و بهبود کیفیت یونجه زراعی (*Medicago sativa*) به استفاده موثر از 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 فوق الذکر، مهم باشد.

نشانگرها مولکولی با انواع متعدد و مزایای بسیار، به عنوان یک ابزار تکمیلی، همراه نشانگرها مورفو-لوزیکی و فیزیولوزیکی در بررسی روابط فیلولوزیکی 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 نشانگرها مولکولی، نشانگرها 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 تواریثی، نقشه‌یابی 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

۵ گیاه به صورت تصادفی انتخاب و از برگ های سالم و جوان هر گیاه نمونه برداری صورت گرفت. برگ های جمع آوری 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 نانودرایپ انجام شد.

مواد و روش ها

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 گیاهچه ها، از هر گلدان

جدول ۱- شماره دسترسی توده های یونجه، محل جمع آوری، کد جغرافیایی و شماره افراد هر توده

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

شماره دسترسی ^۱ Accession Number ^۱	محل جمع آوری Origin	کد ^۲ Code ²	شماره دسترسی ^۱ Accession Number	محل جمع آوری Origin	کد ^۲ Code
44-1	Zarinshahr1	زین شهر ۱	C	268	Fezve3
23-1	Damghan	دامغان	C	11-1	Kahrizsang
126-1	Fezve1	فرو ۱	C	126	Fezve4
68	Zarinshahr2	زین شهر ۲	C	188	Rafsanjan
42	Kohpaye1	کوهپایه ۱	C	25	Sabzevar
47	Kashan1	کاشان ۱	C	24	Yazd
9-2	Gorgan1	گرگان ۱	C	145	Jiroft
39	Kohpaye2	کوهپایه ۲	C	29	Gonaabad
27	Shahrood	شهرود	C	10-2	Neishabor
45	Golestankoh	گلستانکوه	C	34-2	Birjand 1
67	Gorgan2	گرگان ۲	C	6	Sirjan
83	Falavarjan	فالاورجان	C	34-1	Birjand 2
30-2	Varamin	ورامین	C	36-1	Shahrebabak
147-1	Fezve2	فرو ۲	C	4	سیستان و بلوچستان
8	Esfahan	اصفهان	C	32	Tribat
14-2	Kashan2	کاشان ۲	C	56-2	Bam
5	Meyme	میمه	C		به

۱- بدراکوتیپ ها با کدهای ارائه شده در جدول از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی اصفهان قابل دسترس می باشد

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

۲- کد توده ها بر اساس طول جغرافیایی منطقه جمع آوری. C برای نمونه های مرکز و E برای نمونه های شرق ایران

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

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 مقطور دو بار استریل،

واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR)

ده نشانگر ریز ما هواره موجود در منابع اطلاعاتی برای انجام این بررسی استخراج و مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۲) (Bernadette *et al.*, 2003, Diwan *et al.*, 2000 et al.). واکنش زنجیره ای پلیمراز، در

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

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'-tcgcatctgcgtccact-3' 5'-ccattgcggggctactct-3' 5'-gccgatggactaatgttag-3'	5	4	80	2.8
B21E13	L R 5'-aaatcttgcttctcag-3' 5'-ccctgggttttgcacag-3'	6	4	66	2.18
MTIC332	L R 5'-ggtcatacgagctccat-3' 5'-gcttgttcttcaagctc-3'	6	5	83	3.62
B14B03	L R 5'-accgtacttggtttatgc-3' 5'-tggaaatttggatataaggaa-3'	6	5	85.7	3.5
MTIC432	L R 5'-ggccataagaactccactt-3' 5'-gatgaaaaatgaaaagaac-3'	5	4	80	2.68
FMT13	L R 5'-caaaaactcaacttaaacacac-3' 5'-taaaaaacggaaagagtggtag-3'	7	6	85.7	3.04
AFct45	L R 5'- gcatctttctttgcctc-3' 5'-attcacacaacccatctc-3'	8	7	87.5	4.58
MAL369471	L R 5'-aaacccttagcaccgaca-3' 5'-cgaacctcgaattaccaaagtct-3'	4	3	75	1.08
ENOD20	L R 5'-ttgagtagctttgggtgtc-3' 5'-gcctgaactattgtaatgg-3'	7	7	100	5.66
MTIC250	L R 5'-cgttgatgatgttctgtatg-3'	8	5	62.5	2.87
Average میانگین		6.2	5.2	80.64	3.2

میزان اطلاعات چند شکلی برای هر جفت آغازگر، N تعداد کل باندها برای هر جفت آغازگر و β درصد چند شکلی (تعداد جایگاه های چندشکل تقسیم بر تعداد کل جایگاه ها) برای هر جفت آغازگر می باشد. 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 می دهد (Anderson *et al*, 1993, Powell, *et al* 1996). پارامتر های مربوط به ساختار ژنتیکی بین H_S , H_T , G_{ST} و N_M و درون زیر جمعیت ها POPGENE32 (N_c , N_a و I) با استفاده از نرم افزار (Yeh, 1999) بررسی محاسبه شدند (جدول های ۴ و ۵). روابط ژنتیک بین نمونه ها بر اساس تجزیه به مختصات اصلی با استفاده از نرم افزار DARwin ۵ انجام شد (شکل ۱). روابط ژنتیکی بین نمونه ها 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 ریز ما هواره به کار رفته در این آزمایش چند شکلی داشتند و در مجموع ۶۲ نوار نمره دهی 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 250 MTIC با کمترین درصد چند شکلی تا ۱۰۰ درصد برای آغازگر 20 ENOD با بیشترین درصد چند شکلی، متغیر بود و میانگین میزان چند شکلی، $80/64$ درصد محاسبه شد (جدول ۲). فلاتحتی و همکاران (Falahati-Anbaran *et al*, 2005)

انجام شد. واکنش زنجیره ای پلیمراز در دستگاه ترمو سایکلر (Bio Rad, USA) با برنامه زمانی چهار دقیقه و اسرشته 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 می شود 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. فرآوردهای واکنش زنجیره ای پلیمراز با پنج میکرو لیتر رنگ فرمamid ۹۸ درصد محلوت و قبل از بارگذاری به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه و اسرشته و سپس بلا فاصله به توده یخ منتقل شدند. ده میکرو لیتر از محلوت فرآورده واکنش زنجیره ای پلیمراز و رنگ فرمamid، بر روی ژل پلی اکریلامید و اسرشته 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 جایگاه ها) انجام و سپس رنگ آمیزی ژل با استفاده از روش نیترات نقره انجام شد (Bassam *et al*, 1991).

تجزیه و تحلیل داده ها

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

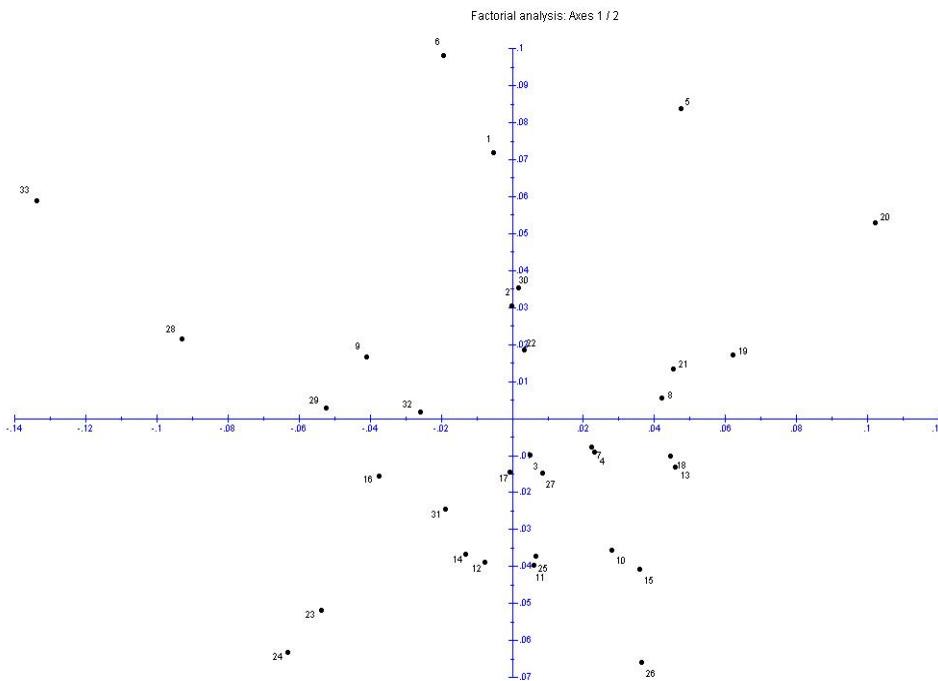
$$PIC = 1 - \sum_{I=1}^N P_I^2 \quad (1)$$

(Prasad *et al*, 2000) و همچنین شاخص نشانگر

(Marker Index) با استفاده از فرمول

$$MI = PIC.N.\beta \quad (2)$$

برای کلیه آغازگرها محاسبه شد که PIC میانگین



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

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

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 ژنو تیپ ها و تعداد آغازگرهای ریز ما هواره 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 Anderson *et al*, 1993) و Powell *et al*, 1996).

تنوع ژنتیکی درون زیو جمعیت ها
میانگین شاخص های درون جمعیتی شامل آلل های

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

میزان اطلاعات چندشکلی (PIC) برای هر جفت آغازگر، به طور جداگانه برای کل توده ها و توده های مرکز و شرق ایران محاسبه شد و میانگین این شاخص برای کل توده ها ۰/۶۲ و توده های 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 نمونه ها را مشخص کند. بر اساس نتایج برخی آزمایش ها، میزان PIC متفاوت بوده و نمی تواند عدد

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

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

نام آغازگر Primer name	کل جمعیت Total Population PIC	(C) زیر جمعیت مرکز PIC of Central subpopulation	(E) زیر جمعیت شرق 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
میانگین	0.62	0.61	0.61
Average of PIC			

زیر جمعیت مرکز و شرق به ترتیب ۰/۲۹ و ۰/۳ و شاخص اطلاعاتی شانون به ترتیب ۰/۴۶ و ۰/۴۵ محاسبه شد. نتایج نشان می دهد که اختلاف معنی داری بین شاخص های محاسبه شده در هر دو زیر جمعیت، وجود نداشته و هر دو زیر جمعیت، با وجود اختلاف در تعداد اعضای آنها (مرکز ۱۰۰ گیاه و شرق ۶۵ گیاه) ساختار ژنتیکی یکسانی داشتند.

مشاهده شده (Na)، تعداد آلل های موثر (Ne)، تنوع ژنی (H) و شاخص اطلاعاتی شانون (I) برای کل جمعیت و زیر جمعیت های مرکز و شرق به تفکیک در جدول ۴ ارائه شده است. میانگین آلل های مشاهده شده برای کل جمعیت و زیر جمعیت های مرکز و شرق مساوی و برابر ۱/۹۶ و میانگین تعداد آلل های موثر در زیر جمعیت مرکز ۱/۴۸ و در زیر جمعیت شرق ایران ۱/۴۹ محاسبه شد. تنوع ژنی نی (H) نیز در هر دو

جدول ۴- شاخص های اندازه گیری شده در مورد تنوع ژنتیکی کل جمعیت و درون زیر جمعیت های یونجه

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

شاخص Statistic	کل جمعیت Total population	زیر جمعیت مرکز (C) Central population	زیر جمعیت 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

=تعداد آلل مشاهده شده، Ne=Observed number of alleles, Ne= Efficient number of alleles, H= Neis gene diversity, I= Shannons information index

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

شد. مقدار تنوع ژنی در جمعیت نهایی، حاصل جمع تنوع ژنی در داخل زیر جمعیت ها و تنوع ژنی بین زیر جمعیت ها می باشد (Nei, 1973). نتایج نشان داد که مقدار تنوع ژنی در جمعیت نهایی با متوسط تنوع ژنی در داخل زیر جمعیت ها مساوی و مقدار تنوع ژنی بین زیر جمعیت ها تقریباً صفر بوده و هر دو زیر جمعیت

تنوع ژنتیکی بین زیر جمعیت ها و اکو تیپ ها

جهت بررسی روابط بین زیر جمعیت های مربوط به مرکز و شرق ایران، شاخص های 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 جمعیت ها (H_S)، ۰/۳ محسوبه

در درون اکوتبها بود و در واقع تنوع کمی بین اکوتبها وجود داشت. این موضوع نشان می‌دهد که اکثر تنوع محاسبه شده حاصل تنوع میان افراد درون اکوتبها بوده و اکوتبها 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 هتروزیگوستی بالایی داشته و جمعیت‌های مختلف ناهمگن بودند.

ساختار یکسانی داشتند. ضریب تمایز ژنی بین جمعیت‌ها 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 اکوتبها شاخص‌های بین جمعیتی محاسبه شدند (جدول ۶) و نتایج نشان داد که بیش از ۷۰ درصد تنوع نهایی در اکوتبها حاصل تنوع

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

= تنوع ژنتیکی نهایی، S_H = تنوع ژنتیکی داخل زیرجمعیت‌ها (مرکز و شرق)، G_{ST} = ضریب تمایز ژنی و N_M = 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 اکوتب‌های 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

= تنوع ژنتیکی نهایی، S_H = تنوع ژنتیکی درون اکوتب‌ها، G_{ST} = ضریب تمایز ژنی و N_M = جریان ژنی

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

دندروگرام حاصل از روش UPGMA نیز مؤید پراکندگی زیاد اکوتبها می‌باشد (شکل ۲). در آزمایش حاضر ۶ و ۵ اکوتب به ترتیب از نقاط مختلف استان‌های خراسان و کرمان جمع‌آوری شدند و همانطور که دندروگرام نشان می‌دهد، اکوتب‌های متعلق به یک استان در نقاط مختلف پراکنده هستند. همچنین نزدیک

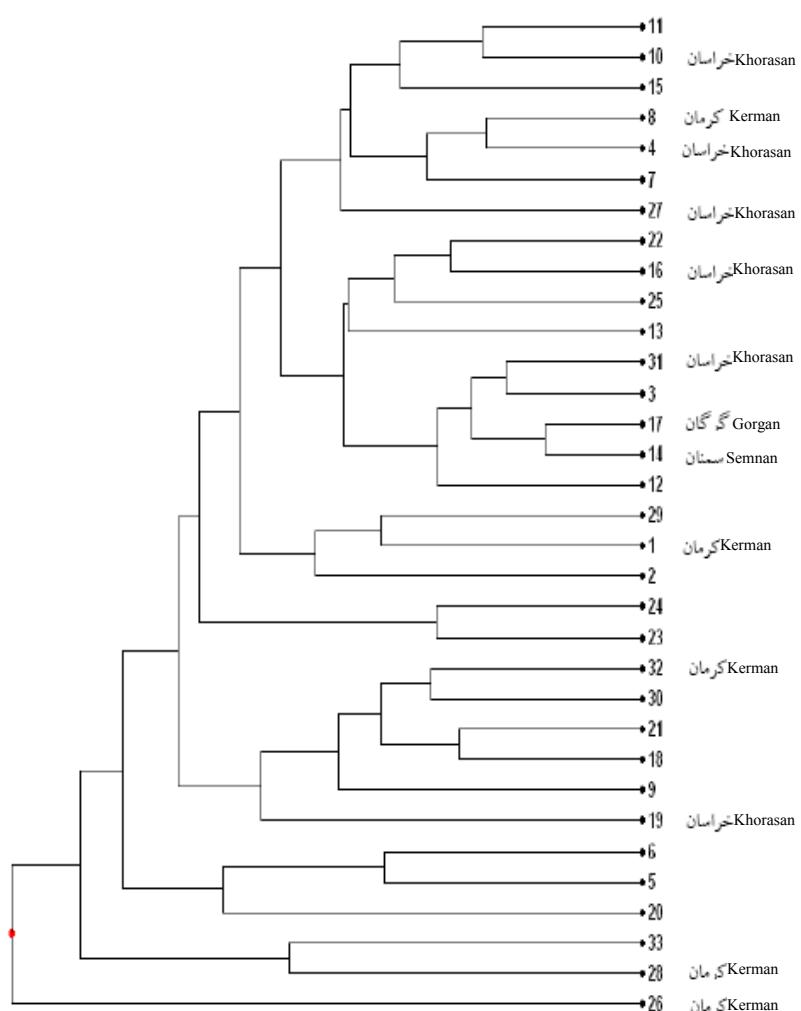
تجزیه به مختصات اصلی

بررسی روابط ژنتیک بین اکوتب‌ها 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 اکوتب‌ها وجود داشته و اکوتب‌ها در هر چهار ناحیه‌ی نمودار پراکنده هستند.

دندروگرام حاصل از داده های مولکولی، هم پوشانی خوبی با نواحی جغرافیایی نداشت. آن ها گزارش کردند که عدم انطباق داده های مولکولی و مناطق جغرافیایی امری مرسوم در یونجه های کشور می باشد. این موضوع ممکن است ناشی از پدیده جریان ژن بین جمعیت ها و دگرگشن بودن جمعیت های یونجه زراعی باشد.

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

ترین اکو تیپ ها در دندروگرام (شماره های ۱۴ و ۱۷) متعلق به دو استان مختلف (سمنان و گرگان) بودند. این نتایج نشان می دهد که هم پوشانی مناسبی بین داده های 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



شکل ۲- دندروگرام ترسیم شده با روش UPGMA جهت بررسی انطباق داده های 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

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 علوفه‌ای در قالب طرح ۴۰۵ با دانشگاه تهران پرداخت شده است که بدبینویسیله تشکر می‌شود.

از نظر ساختار ژنتیک، تنوع بسیار بالایی بین افراد وجود دارد. این تنوع زیاد ممکن است نتیجه‌ی دگرگشن بودن گیاه یونجه (۱۰ درصد خودگشندی)، 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

منابع مورد استفاده

- 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

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 populations 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-Marof, 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.

- 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, Universty of Alberta, Canada.
<http://www.ulberta.ca/fyeh/>

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

Rezaie, M¹., M. R. Naghavi² and R. Maali-Amiri³

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 using SSR 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 consequences 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