

## ارزیابی تنوع ژنتیکی بین و درون اکوتیپ‌های یونجه (*Medicago sativa* L.) با نشانگرهای RAPD

### Genetic Diversity Among and Within of Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Ecotypes Based on RAPD Markers

حسن منیری فر<sup>1\*</sup>، احمد رزبان<sup>2</sup>، مصطفی ولی‌زاده<sup>3</sup>، جلال صبا<sup>4</sup>، شهین نوع پرور<sup>5</sup>، فاطمه محمدزاده<sup>6</sup> و مریم برقی<sup>7</sup>

#### چکیده

در این بررسی تنوع ژنتیکی در 30 اکوتیپ یونجه ایرانی جمع‌آوری شده از منطقه شمال غرب کشور با استفاده از نشانگرهای RAPD ارزیابی شد. استخراج DNA در 30 نمونه از هر اکوتیپ انجام شد. ده آغازگر از 30 آغازگر تصادفی ارزیابی شده، مجموعاً 78 نوار چند شکل ایجاد کردند و تعداد نوارهای چند شکل از 36 نوار تا 68 نوار متفاوت بود. بیشترین میانگین سطح تنوع ژنتیکی براساس شاخص‌های نی و شانون در اکوتیپ ورزقان - جوشین مشاهده شد و کمترین آن متعلق به اکوتیپ تبریز - اسپره خون بود. بیشترین فاصله ژنتیکی  $F_{ST}$  بین اکوتیپ‌های مرند - زوزق و بستان آباد - باش کند و کمترین آن مربوط به اکوتیپ‌های ورزقان - جوشین و ورزقان - الهرد بود که این نتایج با فواصل جغرافیایی مناطق مورد کشت اکوتیپ‌های فوق مطابقت نشان داد. تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که 34/63 درصد از تنوع کل مربوط به تنوع ژنتیکی بین اکوتیپ‌ها و 65/37 درصد مربوط به تنوع ژنتیکی درون اکوتیپ‌ها می‌باشد که حاکی از تنوع قابل ملاحظه و وجود پتانسیل عظیم ژنتیکی برای کارهای اصلاحی آتی می‌باشد. تجزیه خوشه‌ای 30 اکوتیپ یونجه را در 4 خوشه دسته‌بندی نمود. اکوتیپ بستان آباد - باش کند به صورت انفرادی در یک گروه مستقل قرار گرفت. این اکوتیپ از نظر ویژگی‌های اقلیمی منطقه مورد کشت نیز متفاوت از سایر اکوتیپ‌ها بود به طوری که ارتفاع منطقه جمع‌آوری 2400 متر و در اقلیم بسیار سرد واقع شده است و جزو اکوتیپ‌های متحمل به سرما می‌باشد. به نظر می‌رسد ارتفاع ناحیه جغرافیایی اکوتیپ‌ها دارای بیشترین سهم در تاثیرگذاری بر روی ساختار ژنتیکی آن‌ها بوده است.

واژه‌های کلیدی: یونجه، تنوع ژنتیکی، نشانگرهای RAPD، واریانس مولکولی

1. استادیار پژوهش مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان شرقی، تبریز
2. کارشناس محقق مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان شرقی، تبریز
3. استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز
4. استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان
5. دانش آموخته کارشناسی ارشد اصلاح نباتات دانشگاه تبریز
6. دانش آموخته کارشناسی ارشد اصلاح نباتات دانشگاه زنجان
7. دانش آموخته کارشناسی ارشد اصلاح نباتات دانشگاه زابل

\*: نویسنده مسئول

تتراپلوئید را گروه‌بندی نمایند. آن‌ها نشان دادند که تنوع ژنتیکی تقریباً در حد مساوی بین و درون جمعیت قابل توزیع است و از تحقیقات خویش نتیجه گرفتند که چنین روشی برای تشخیص واریته‌ها می‌تواند موثر باشد. دهقان‌شعار و همکاران (Dehghan Shoar *et al.*, 1997) نیز با استفاده از نشانگرهای RAPD اقدام به تجزیه ژنتیکی بین و درون جمعیت‌های یونجه کردند. مواد آزمایشی آن‌ها شامل 6 رقم ایرانی، 2 رقم نیوزلندی و 2 رقم آمریکایی بود. از هر رقم 40 گیاه مورد بررسی قرار گرفت و نشان دادند که بین ارقام و بخصوص ارقام ایرانی، تنوع وسیعی وجود دارد. آن‌ها پیشنهاد کردند که تجزیه ژنتیکی جمعیت‌ها در یونجه با استفاده از نشانگرهای RAPD می‌تواند برای اصلاح ارقام و هم‌چنین در برنامه‌های کنترل و گواهی بذر و ارزیابی خلوص آن‌ها مورد استفاده قرار گیرد.

جنزوفسکی و همکاران (Jenczewski *et al.*, 1992) برای تشخیص تفاوت بین ارقام اصلاح شده و نشده یونجه اسپانیایی از نشانگرهای RAPD استفاده کردند و نتایج را با بررسی آلوزیم مقایسه و اظهار نمودند که اگرچه نشانگرهای RAPD در داخل ارقام فاصله ژنتیکی کمتری نسبت به آلوزیم نشان داد ولی کیفیت و کمیت الگوی باندهای ارقام کاملاً با آلوزیم یکسان بود.

موسیال و همکاران (Musial *et al.*, 2000) از نشانگرهای RAPD در تجزیه فاصله ژنتیکی درون ارقام یونجه استرالیایی استفاده کردند و اظهار داشتند که وجود فاصله ژنتیکی در درون جمعیت‌های یونجه تشخیص فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌های یونجه را مشکل می‌سازد. آن‌ها ارقام یونجه منتخب از گونه‌های *Medicago falcata* و *Medicago sativa* را در استرالیا مورد بررسی قرار دادند. از هر ده کولتیوار 19 گیاه مورد تجزیه قرار گرفت و با استفاده از 11 آغازگر RAPD، 96 باند پلی‌مورفیک ثبت شد و شباهت ژنتیکی بین ارقام و درون آن‌ها اندازه‌گیری شد که درون ارقام شباهت ژنتیکی از 0/43 تا 0/51 و بین ارقام از 0/31 تا 0/49 بود. بنابراین جدا کردن ارقام از یک‌دیگر میسر نگردید و هم‌چنین اظهار داشتند که وجود فاصله ژنتیکی زیاد در بین و درون ارقام برای ارقام سنتتیک خیلی مهم می‌باشد. کازکارو (Cazcarro 2000) 50 نمونه جمع‌آوری شده مربوط به گونه‌های *M. sativa* و *M. falcata* از آسیا و اروپا را مورد بررسی قرار دادند. گروه‌بندی نمونه‌ها بر اساس نتایج حاصل از نشانگرهای RAPD و AFLP نشان داد که بین صفات مرفولوژیکی و تنوع ژنتیکی رابطه مستقیمی وجود

یونجه (*Medicago sativa* L.) یکی از مهم‌ترین گیاهان علوفه‌ای است و اهمیت زیادی در تغذیه دام‌ها و افزایش فراورده‌های دامی دارد. این گیاه که اغلب به‌عنوان ملکه نباتات علوفه‌ای نامیده می‌شود از مهم‌ترین گیاهان علوفه‌ای دنیا به‌شمار می‌رود (Tucak *et al.*, 2008). در این که ایران ناحیه مرکزی خاستگاه جغرافیایی یونجه است، توافق کلی وجود دارد ولی اهمیت و وفور آن در منطقه شمالغرب کشور متمایز از سایر مناطق می‌باشد. بنابراین ژرم پلاسمی بسیار غنی از این گیاه در منطقه وجود دارد (Monirifar & Barghi 2009).

آگاهی از سطح تنوع ژنتیکی و برآورد دقیق آن در ژرم‌پلاسم‌های گیاهی و تعیین روابط ژنتیکی بین مواد اصلاحی، پایه و اساس بسیاری از برنامه‌های اصلاحی است. اهمیت تنوع ژنتیکی در گیاهان از دو دیدگاه مورد توجه است: نخست تنوع ژنتیکی شرط لازم برای رسیدن به محصول بیشتر و پایداری عملکرد است. از سوی دیگر تنوع ژنتیکی، منابع ژنتیکی مفید برای برنامه‌های اصلاحی را شناسایی کرده و باعث حفظ آن‌ها می‌شود (Gepts & Papa 2003). به همین دلیل اصلاح‌گران در جستجوی منابع جدید ژنتیکی و روش‌های استفاده از آن‌ها به‌منظور افزایش و پایداری عملکرد در مواجهه با تنش‌های جدید هستند. به نژادگران برای این که بتوانند ارقام جدیدی از گیاهان زراعی را معرفی کنند، نیازمند دسترسی به ژرم پلاسم‌های فراوانی هستند که یا از بین رفته‌اند و یا در حال از بین رفتن هستند. بنابراین اطلاع از میزان تنوع ژنتیکی، بهره‌برداری صحیح و دقیق و حفاظت از منابع ژنتیکی در پیشبرد برنامه‌های به نژادی و مطالعه روند تکامل گیاهان زراعی در جهت تبیین اصول صحیح برنامه ریزی‌های به نژادی حایز اهمیت است (Ford-Lloyd 2001).

گزارش‌های متعددی مبنی بر استفاده از نشانگرهای RAPD برای برآورد تنوع ژنتیکی وجود دارد. گاردی و همکاران (Gerardi *et al.*, 1997) با استفاده از پنج آغازگر RAPD فاصله ژنتیکی بین 8 رقم یونجه اصلاح شده و نشده را بررسی و گزارش نمودند که در بیشتر مکان‌های ژنی چند شکلی بالایی وجود دارد. آن‌ها تنوع ژنتیکی بین و درون جمعیت را محاسبه و اذعان نمودند که بین جمعیت‌ها به‌طور قابل ملاحظه‌ای، این تنوع معنی‌دار است. کروچمور و همکاران (Crochemor *et al.*, 1996) با استفاده از نشانگرهای RAPD توانستند 26 جمعیت یونجه

دارد که بر اساس آن دو کلاستر مشخص گردید. این نتایج مشابه نتایج مربوط به تحقیقات بیر و همکاران (Beer *et al.*, 1993) بود که در یولاف روی صفات مرفولوژیکی و تنوع ژنتیکی کار کرده بود و نتایج مشابهی حاصل شده بود. توکاک و همکاران (Tucak *et al.*, 2008) تنوع ژنتیکی را از طریق نشانگر RAPD در 14 رقم یونجه *M. sativa* به همراه یک جمعیت از *M. falcata* مورد بررسی قرار دادند و براساس نتایج حاصله پیشنهاد نمودند که نشانگرهای RAPD می توانند ابزار مفید و توانمند برای برآورد تنوع ژنتیکی در ژرم پلاسما متنوع یونجه باشند. هم چنین جانسون و همکاران (Johnson *et al.*, 2002) برای تشخیص سطوح مقاومت در گیاه یونجه و جمعیت های آن آزمایشاتی با PCR انجام دادند.

کیشا و همکاران (Kisha *et al.*, 2002) در اندازه گیری تنوع ژنتیکی در بین یونجه های ترکیه، استرالیا و اسپانیا به وسیله نشانگرهای متفاوت، ابراز داشتند که نشانگرهای مولکولی به طور وسیعی برای اندازه گیری تنوع ژنتیکی استفاده می شود ولی درستی و صحت اطلاعاتی که از این نشانگرها به دست می آید اغلب ناشناخته است و انتخاب نشانگرها یا بر اساس هزینه کم آن و یا بر اساس امکانات آزمایشگاه صورت می پذیرد. آن ها برای آزمایش کارایی نشانگرها در اندازه گیری تنوع ژنتیکی در جمعیت های سنتتیک از 96 گیاه از سه جمعیت یاد شده استفاده کردند و نشانگرهای SSR و RAPD را به کار بردند و نتیجه گرفتند که واریانس ژنتیکی با هر کدام از نشانگرها همبستگی دارد و می توان از هر کدام از نشانگرها در تعیین فاصله ژنتیکی استفاده کرد.

این پژوهش به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی درون و بین 30 اکوتیپ یونجه مناطق مختلف آذربایجان و هم چنین گروه بندی آن ها با استفاده از نشانگرهای RAPD، جهت استفاده در برنامه های اصلاحی و تولید واریته های پر محصول انجام شد.

#### مواد و روش ها

مواد گیاهی: مواد گیاهی شامل 29 توده محلی جمع آوری شده از مناطق مختلف استان آذربایجان شرقی و یک رقم اصلاح شده بود. توده های محلی با مراجعه حضوری به مناطق مورد کشت یونجه و کسب اطمینان از محلی بودن بذور جمع آوری شد. لیست اکوتیپ های مورد استفاده به همراه مشخصات مربوطه در جدول یک ذکر شده است.

#### استخراج DNA

از هر اکوتیپ 30 بذر انتخاب شد و استخراج DNA از هر تک بذر و با روش کانک و یانگ (Kang & Yang 2004) با بعضی از تغییرات به شرح زیر انجام شد:

1- هر بذر در هاون به همراه 200 میکرولیتر از بافر استخراج که قبلاً در انکوباتور در 60 درجه سانتی گراد گرم شده بود، کاملاً له شده و تمام مواد داخل هاون به یک تیوب منتقل شد.

2- تیوب ها در دستگاه سانتریفوژ در 10000 دور در دقیقه (rpm) به مدت 5 دقیقه سانتریفوژ شدند.

3- مایع فوقانی (سوپرناتانت) هر تیوب به تیوب دیگری منتقل شده و هم حجم آن ایزوپروپانول به آن ها اضافه شد.

4- تیوب ها چند بار به آرامی وارونه شده و در این مرحله، کلاف کاملاً شفاف و سفید رنگی که حاوی DNA بود، در هر تیوب مشاهده گردید.

5- پس از آن تیوب ها به مدت 5 دقیقه در 5000 دور دقیقه سانتریفوژ شدند.

6- مایع فوقانی هر تیوب دور ریخته شد. رسوب تشکیل شده در ته تیوب (پلیت) DNA است.

7- تیوب ها به طور وارونه گذاشته شدند تا الکل درون آن ها کاملاً خشک و برطرف شود.

8- در نهایت به هر تیوب، 50 میکرولیتر بافر TE اضافه شده، تیوب ها در دمای اتاق به مدت چند ساعت قرار داده شدند. RNA بعد از مدتی حذف می شود، بنابراین از RNase استفاده نشد.

کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگاروز و روش اسپکتروفتومتری بررسی شد.

#### انجام PCR، بارگذاری و امتیازدهی نوارها

جدول 2 مشخصات آغازگرهای تصادفی مورد استفاده را نشان می دهد. آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش، از شرکت سیناژن به صورت محلول منجمد تهیه و در فریزر -20 درجه سانتی گراد نگهداری شدند. 38 آغازگر تصادفی با استفاده از 5 نمونه تصادفی از بین تمام نمونه ها، مورد بررسی قرار گرفتند. این بررسی با غلظت رقیق نشده و غلظت های مختلف رقیق شده به وسیله آب استریل دوبار تقطیر شده انجام شد و در نهایت 10 آغازگر با الگوی نواری مناسب برای انجام واکنش زنجیره ای پلی مرز انتخاب شدند. ابتدا برنامه PCR به منظور به دست آوردن دمای مناسب بازسرشتی برای

ارزیابی تنوع ژنتیکی بین و درون اکوتیپ‌های یونجه (*Medicago sativa* L.) ...

به ازای 300 میلی‌لیتر ژل اضافه و پس از خنک شدن، ژل در قالب مربوطه ریخته شد.

به هر تیوپ PCR واکنش RAPD، 2 میکرولیتر بافر بارگذاری اضافه و از هر نمونه 10 میکرولیتر در هر چاهک بارگذاری شد. ولتاژ مورد نظر برای عمل الکتروفورز 90 ولت و مدت زمان الکتروفورز 3/5 ساعت در نظر گرفته شد.

الگوی نواری حاصل مورد بررسی قرار گرفت و برای نوارهای واضح و بدون ابهام با مقادیر صفر و یک (عدم وجود و وجود باند) امتیازدهی به عمل آمد و همچنین برای مشخص شدن اندازه قطعات تکثیر شده از نشانگر وزن مولکولی با اندازه قطعات 100-3000 جفت باز استفاده شد.

آغازگرهای مورد استفاده، با چند نمونه DNA، در دماهای مختلف بازسرستی و اتصال بهینه شده و برنامه PCR تنظیم شد. مراحل واسرشته‌سازی، اتصال آغازگر و بسط، 40 بار تکرار شد و پس از پایان PCR، محصولات PCR، در فریزر -20 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند تا الکتروفورز شوند. جداسازی محصولات تکثیر شده PCR با استفاده از ژل آگارز 1/5 درصد انجام و به روش رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید آشکارسازی شدند. برای تهیه ژل، بر روی آگارز بافر TAE (1x) اضافه و تا حل شدن کامل جوشانده شد. پس از رسیدن دمای ژل به حدود 50 درجه سلسیوس، مقدار 5 میکرولیتر محلول 10 میلی‌گرم در میلی‌لیتر اتیدیوم بروماید،

جدول 1: نام و محل جمع‌آوری اکوتیپ‌های مورد مطالعه در ارزیابی تنوع ژنتیکی بین و درون اکوتیپ‌های یونجه ایرانی با

#### نشانگرهای RAPD

Table 1: Names and collection sites of 30 alfalfa ecotypes used for genetic diversity study based on RAPD

محل جمع‌آوری	Collection site	نام اکوتیپ	Ecotype name
جلفا	Jolfa	مارزاد	Marzad
کلیبر	Kaleibar	قران‌چای	Gran chay
اهر	Ahar	لقلان	Leghan
مرند	Marand	زنورق	Zonorag
مرند	Marand	سیوان	Sivan
اسکو	Oskou	خورخور	Khor-khor
تبریز	Tabriz	ساتلو	Sattelou
ملکان	Malekan	اسماعیل‌آباد	Smail-abad
مراغه	Maraghe	کل تپه	Koul-tapa
عجب‌شیر	Ajab-Shir	آمالو	Almalou
مراغه	Maraghe	کرده‌ده	Kordadeh
تبریز	Tabriz	سفیده‌خان	Sefidkhan
بستان‌آباد	Bostan-Abad	قره‌بابا	Gara-baba
هشترود	Hasht-Roud	ذوالبین	Zolbin
هشترود	Hasht-Roud	زاویه	Zavie
هشترود	Hasht-Roud	سیویار	Seiviar
هشترود	Hasht-Roud	اکرم‌آباد	Akram-abad
میانه	Miyane	بالسین	Balsin
بستان‌آباد	Bostan-Abad	باش‌کند	Bash-kand
بستان‌آباد	Bostan-Abad	عین‌الدین	Ein-alдин
سراب	Sarab	بافتان	Baftan
اردبیل	Ardabil	ایلان‌جوق	Ilan-jough
هریس	Heris	خواجه	Khaje
هریس	Heris	گوراوان	Goravan
ورزقان	Varzgan	دیزج‌صفرعلی	Dizaj-safarali
اهر	Ahar	کردلر	Kordlou
ورزقان	Varzgan	خسروانق	Khosrovanagh
ورزقان	Varzgan	چلناب	Chalnab
ورزقان	Varzgan	المرد	Almard
خسروشهر	Khosro-Shahr	قره‌یونجه	Gara-yonjeh

جدول 2: آغازگرهای مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای تجزیه RAPD

Table 2: Description of arbitrary oligonucleotide primers used for RAPD analysis

نام آغازگر Primer	توالی Sequence	تعداد نوار چند شکل Number of bands	اندازه باند Band size range
OPJ4	CCGAACACGG	5	550-1250
B1	GGTTCGCTCC	7	350-900
B6	TGCTCTGCCC	10	230-1400
B7	GGTGACGCAG	11	250-1500
B8	GTCCACACGG	8	270-1100
OPJ13	CCACACTACC	9	220-1200
B10	CTGCTGGGAC	10	370-3000
OPA1	CAGGCCCTTC	6	300-1600
OPJ19	GGACACCACT	6	300-1100
OPJ20	AAGCGGCCTC	8	200-1250

## تجزیه‌های آماری

گراردی و همکاران (Gherardi *et al.*, 1997) نیز تنوع ژنتیکی در 8 اکوتیپ یونجه را با استفاده از ده آغازگر RAPD بررسی کردند میانگین درصد چند شکلی درون جمعیتی در بررسی آن‌ها 70/87 درصد بود. میانگین تعداد نوارهای چندشکلی RAPD در یونجه در مطالعات یو و پائولس (Yu & Pauls 1993)، نگری و همکاران (Negri *et al.*, 1995) و منگونی و همکاران (Mengoni *et al.*, 2000) به ترتیب 5، 8/6 و 5/12 گزارش شده است. زیاد بودن تعداد نوار به ازای هر نشانگر، نشان از تنوع زیاد در بین ارقام مورد مطالعه است (Agrama & Tuinstra 2003). زیاد بودن تعداد نشانگر می‌تواند ناشی از سطح بالای پلوئیدی نیز باشد (Kidwell *et al.*, 1994). نمونه‌ای از الگوی نواربندی با آغازگرهای متفاوت در اکوتیپ مرند (شماره 4) در شکل یک نشان داده شده است.

پس از امتیازدهی باندها، جدول دو طرفه‌ی ماتریس نوار و اکوتیپ تهیه و داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای آماری POPGENE، NTSYS-pc، ARLEQUIN(ver3) تجزیه و تحلیل شدند و تعداد کل نوارهای چند شکل، تنوع ژنتیکی کل (Ht) و درون اکوتیپ‌ها (Hs) و درجه تمایز ژنی بین آن‌ها برآورد شد. هم‌چنین فاصله‌ی ژنتیکی بین اکوتیپ‌ها محاسبه شده، تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) برای تفکیک واریانس کل مولکولی به واریانس بین و درون اکوتیپ‌ها به عمل آمد (Huff 1997) و ژنوتیپ‌ها با استفاده از روش تجزیه خوشه‌ای گروه‌بندی شدند و دندروگرام به روش UPGMA رسم شد.

## نتایج و بحث

## چندشکلی نشانگرهای RAPD در اکوتیپ‌های مورد مطالعه

از 30 آغازگر تصادفی ارزیابی شده، تعداد ده آغازگر با الگوی نواربندی مناسب و چند شکل برای مطالعه اکوتیپ‌ها استفاده شدند و ده پرایمر مورد استفاده مجموعاً 78 نوار چندشکل ایجاد کردند که در محدوده 150 تا 2700 جفت باز قرار داشتند. تعداد کل نوارهای چندشکل درون اکوتیپ‌ها از 36 نوار در اکوتیپ شماره 12 (تبریز-اسپره خون) تا 68 نوار در اکوتیپ 27 (ورزقان-جوشین) متفاوت بود. هم‌چنین در بیان درصدی می‌توان اظهار داشت که میزان نوارهای چندشکل درون اکوتیپ‌ها در 30 اکوتیپ مورد مطالعه از 46/15 درصد در اکوتیپ شماره 12 (تبریز-اسپره خون) تا 87/18 درصد در اکوتیپ 27 (ورزقان-جوشین) متفاوت بود (جدول 3).

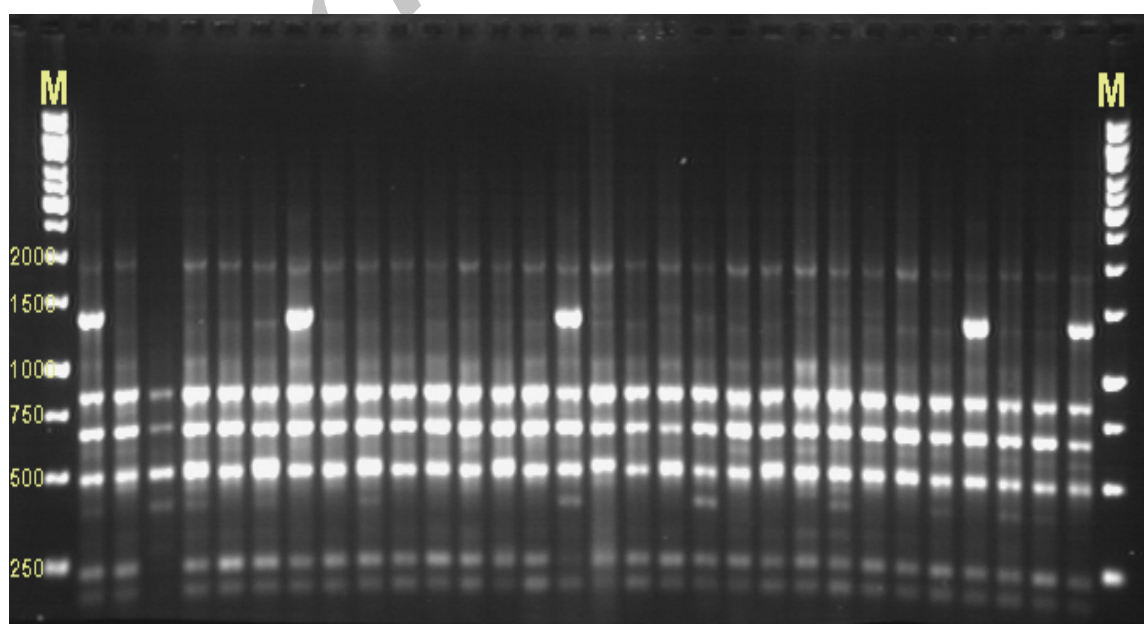
## برآورد تنوع ژنتیکی درون اکوتیپ‌های یونجه

تنوع ژنتیکی درون اکوتیپ‌ها براساس شاخص نی و شاخص شانون محاسبه گردید (Nei 1972; Nei 1973; Nei; 1975 Shannon & Weaver). بیشترین میانگین سطح تنوع ژنتیکی براساس هر دو شاخص نی (0/2813) و شانون (0/4205) در اکوتیپ 27 (ورزقان-جوشین) مشاهده شد که حاکی از تطابق برآورد تنوع در هر دو شاخص بود. ولی کمترین میزان تنوع ژنتیکی براساس شاخص نی (0/1567) مربوط به اکوتیپ 19 (بستان‌آباد-باش‌کند) و براساس شاخص شانون (0/2434) کمترین میزان تنوع مربوط به اکوتیپ شماره 12 (تبریز-اسپره خون) بود (جدول 3).

جدول 3: میانگین تنوع ژنتیکی در 30 اکوتیپ یونجه

Table 3: The mean of genetic diversity in 30 alfalfa ecotype based on RAPD analysis

اکوتیپ Ecotype	تعداد نوار چندشکل Number of bands	درصد نوار چندشکل Polymorphic loci (%)	میانگین تنوع ژنتیکی نی Nei's gene diversity	شاخص شانون Shannon index
1	45	57.69	0.2049	0.3064
2	45	57.69	0.2081	0.3102
3	39	50.00	0.1823	0.2690
4	42	53.85	0.1847	0.2768
5	47	60.26	0.2089	0.3132
6	44	56.41	0.1969	0.2953
7	54	69.23	0.2083	0.3187
8	45	57.69	0.2001	0.3013
9	50	64.10	0.2098	0.3165
10	52	66.67	0.2271	0.3428
11	62	79.49	0.2571	0.3891
12	36	46.15	0.1633	0.3434
13	52	66.67	0.1912	0.32972
14	46	58.97	0.2027	0.3043
15	42	53.85	0.1891	0.2816
16	51	65.38	0.2243	0.3377
17	48	61.54	0.2205	0.3294
18	47	60.26	0.2039	0.3076
19	52	66.67	0.1567	0.2542
20	41	56.56	0.1744	0.2632
21	51	65.38	0.2201	0.3299
22	49	62.82	0.2162	0.3248
23	59	75.64	0.2299	0.3517
24	40	51.28	0.1756	0.2631
25	63	80.77	0.2464	0.3723
26	53	67.95	0.2242	0.3383
27	68	87.18	0.2813	0.4205
28	41	52.56	0.1744	0.2613
29	66	84.62	0.2812	0.4185
30	50	64.10	0.2001	0.3082



شکل 1: الگوی نوار بندی 30 نمونه از اکوتیپ مرند (شماره 4) با آغازگر B6  
Fig 1: RAPD fragments for Marand ecotype (Ecotype 4) using the primer B6

فاصله ژنتیکی براساس شاخص  $F_{ST}$ 

موضوع با یافته‌های فلاجولت و همکاران (Flajoulot *et al.*, 2005) مطابقت نشان داد. آن‌ها تنوع قابل ملاحظه‌ای در درون 7 جمعیت اصلاح شده یونجه نسبت به بین آن‌ها به‌دست آوردند. در سایر بررسی‌های تنوع یونجه با استفاده از نشانگرهای RAPD، واریانس درون جمعیتی، حدود 50 درصد یا بیشتر واریانس ژنتیکی کل را شامل شده است (Gherardi *et al.*, 1997). میزان بالای واریانس درون جمعیتی حتی در صفات کیفی مثل قابلیت هضم و درصد سلولز (Heinrichs *et al.*, 1969)، نسبت برگ به ساقه، قابلیت هضم آنزیمی، وزن خشک و اسید تجزیه کننده لیگنین و سلولز (Julier *et al.*, 2000) هم مشاهده شده است که نشان دهنده هم‌خوانی زیاد صفات مورفولوژیکی به‌ویژه صفات کیفی و نشانگرهای مولکولی است.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی با میانگین درجه تمایز ژنی یا  $Gst$  (0/3335) مطابقت نشان داد. با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان بیان داشت که برخی از اکوتیپ‌های یونجه منبع بالقوه‌ای برای ژن‌های مختلف هستند. یونجه گیاهی است دگرگشن که تنوع بالای درون اکوتیپی در آن ناشی از سیستم تولید مثلی گیاه است و همانند دیگر گونه‌های دگربرور چنان‌که انتظار می‌رفت تنوع ژنتیکی درون اکوتیپ‌ها بیشتر از تنوع ژنتیکی بین اکوتیپ‌ها است.

## تجزیه خوشه‌ای براساس داده‌های مولکولی

برای تعیین روابط ژنتیکی، 30 اکوتیپ یونجه با استفاده از ماتریس ضرایب هم‌نسبی مورد تجزیه خوشه‌ای قرار گرفتند. در این بررسی برای رسم دندروگرام دو روش UPGMA و CLINK براساس فاصله ژنتیکی نی به‌ترتیب با ضرایب هم‌بستگی کوفنتیک  $r=0/73$  و  $r=0/62$  مورد استفاده قرار گرفتند.

اندازه‌گیری فاصله دودویی اکوتیپ‌ها بر اساس فاصله ژنتیکی  $F_{ST}$  نشان داد که حداکثر این فاصله بین اکوتیپ‌های مرند-زنورق و بستان‌آباد-باش‌کند (شماره‌های 4 و 19) برابر 0/63637 و حداقل فاصله بین اکوتیپ‌های ورزقان-جوشین و ورزقان-الهرد (شماره‌های 27 و 29) برابر 0/03551 بود. این نتایج بسیار منطقی به‌نظر می‌رسند چرا که دو اکوتیپ اولی از نظر جغرافیایی در فاصله دور از هم قرار گرفته‌اند و منطقه مورد کشت دو اکوتیپ دیگر نیز کاملاً در مجاورت هم است. هم‌چنین این نتایج حاکی از تنوع خیلی زیاد در درون اکوتیپ‌های یونجه است که ناشی از طبیعت آلوگام و دگرگشنی این گیاه می‌باشد (Jenczewski *et al.*, 1992; Mengoni *et al.*, 2000).

## فاصله ژنتیکی براساس ضریب هم‌نسبی

اندازه‌گیری فاصله اکوتیپ‌ها براساس ضریب هم‌نسبی نیز نتایج مشابه با شاخص  $F_{ST}$  نشان داد. بر اساس این شاخص نیز دو اکوتیپ مرند-زنورق و بستان‌آباد-باش‌کند (شماره‌های 4 و 19) دارای بیشترین فاصله (0/9999) و دو اکوتیپ ورزقان-جوشین و ورزقان-الهرد (شماره‌های 27 و 29) دارای کمترین فاصله (0/036156) نسبت به یکدیگر بودند.

## تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA)

نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که تنوع ژنتیکی بین و درون 30 اکوتیپ یونجه مطالعه شده در این بررسی معنی‌دار است. از تنوع ژنتیکی کل (100%) 34/63 درصد آن مربوط به تنوع ژنتیکی بین اکوتیپ‌ها و 65/37 درصد آن مربوط به تنوع درون اکوتیپ‌ها بود. بنابراین واریانس درون اکوتیپ‌ها سهم عمده‌ای از واریانس کل را شامل می‌شود ولی میزان واریانس بین اکوتیپ‌ها نیز قابل توجه بود (جدول 4). این

جدول 4: تجزیه واریانس مولکولی برای 30 اکوتیپ یونجه

Table 4: Analysis of molecular variance for 30 alfalfa ecotypes

منبع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات انحرافات	درصد واریانس	سطح معنی‌دار
Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variation (%)	Prob.
بین اکوتیپ‌ها	29	3832.589	34.63	0.00
Among ecotypes				
درون اکوتیپ‌ها	870	6805.400	65.37	0.00
Within ecotypes				
$F_{ST}$ :			0.3463	

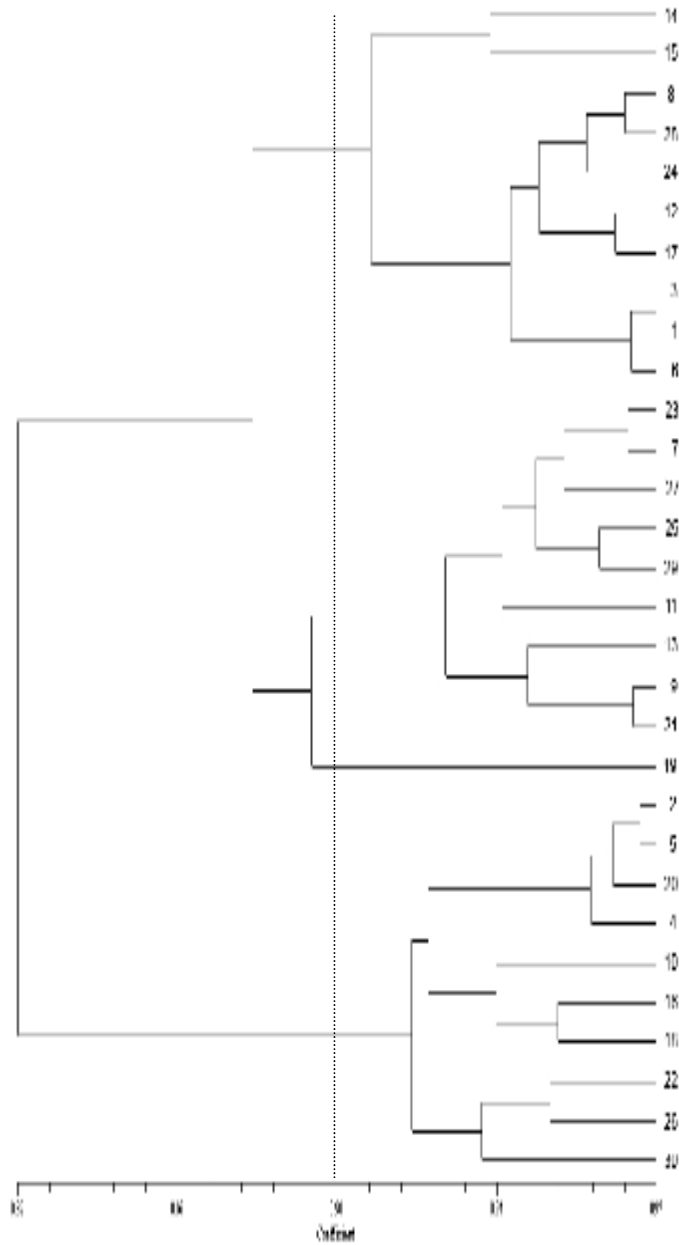
صورت انفرادی یک گروه منحصر به فرد را تشکیل داد از نظر ویژگی‌های اقلیمی نیز متمایز از سایر اکوتیپ‌ها بود. منطقه مورد کشت این اکوتیپ دارای 2400 متر ارتفاع از سطح دریا و جزو اقلیم بسیار سرد می‌باشد (Khalili 1992). به نظر می‌رسد ارتفاع ناحیه جغرافیایی اکوتیپ‌ها دارای بیشترین سهم در تاثیرگذاری بر ساختار ژنتیکی آن‌ها بوده است. با توجه به وجود تنوع ژنتیکی زیاد در ژرم پلاسما مورد مطالعه، می‌توان از این پتانسیل ژنتیکی غنی برای انتخاب ژنوتیپ‌های متنوع به منظور تولید ارقام جدید استفاده کرد.

در کل نتایج این پژوهش نشان‌داد تنوع ژنتیکی و غیر یکنواختی زیادی درون جمعیت‌های بومی وجود دارد و می‌توان از این جمعیت‌ها برای انتخاب ژنوتیپ‌های متنوع به منظور تولید ارقام جدید استفاده کرد. به نظر می‌رسد ارتفاع ناحیه جغرافیایی اکوتیپ‌ها دارای بیشترین سهم در تأثیرگذاری بر روی ساختار ژنتیکی آن‌ها بوده است و استفاده از نشانگرهای RAPD می‌تواند روش مناسبی برای تعیین تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت‌های یونجه باشد.

براساس گروه‌بندی حاصل از هر دو الگوریتم 30 اکوتیپ یونجه به چهار گروه تقسیم شدند. دندروگرام حاصل از هر دو الگوریتم تشابه زیادی نشان دادند به طوری که خوشه‌ها در مقایسه با خوشه همتای خود در دندروگرام دیگر دارای اکوتیپ‌های مشابهی بودند، ولی روش UPGMA براساس فاصله ژنتیکی نی با دارا بودن ضریب کوفنتیک بالاتر انتخاب گردید (شکل 2).

در گروه اول اکوتیپ‌های شماره ذوالبین - زاویه - اسماعیل آباد - چلناب - گوراوان - اسپره خون - اکرم آباد - لقلان - مارزاد - خورخور، در گروه دوم اکوتیپ‌های با شماره‌های خواجه - ساتلو - جوشین - دیزج صفر علی - الهرد - کرده ده - قره بابا - گل تپه - بافتان ، در گروه سوم اکوتیپ شماره 19 (بستان‌آباد- باش کند) و در گروه چهارم اکوتیپ‌های قرانچای-سیران-عین الدین -زنورق-آمالو- سیویار-باسین-ایلانجوق-کردلر-و قره پونجه اصلاح شده قرار گرفتند. اکوتیپ اصلاح شده قره پونجه در این کلاستر قرار گرفت. همه اکوتیپ‌های متعلق به منطقه ورزقان و مراغه در یک گروه (گروه دوم) قرار گرفتند. اکوتیپ شماره 19 که به





شکل 2: تجزیه خوشه‌ای 30 اکوتیپ یونجه بر اساس فاصله ژنتیکی (Nei) به روش UPGMA  
Fig 2: Clustering of 30 alfalfa ecotypes based on Nei's generic distance using UPGMA method

منابع:

جهت ملاحظه منابع به صفحه‌های 7-8 متن انگلیسی مراجعه شود.