



روابط خویشاوندی جنس یونجه در ایران (*Medicago* sp.) بر اساس نشانگر مولکولی RAPD

- فرنگیس فنواتی، پژوهنده مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر
- جواد مظفری، استادیار مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر
- هما صفایی، استادیار مرکز تحقیقات کشاورزی زرقان
- شاهرخ کاظم‌پور اوصالو، استادیار دانشگاه تربیت مدرس

تاریخ دریافت: بهمن ماه ۱۳۸۳ تاریخ پذیرش: تیرماه ۱۳۸۴

E-mail: f_ghanavati83@yahoo.com

چکیده

در این بررسی تعداد ۵۴ جمعیت از ۲۲ گونه جنس یونجه (*Medicago*) جمع آوری شده از رویشگاه‌های طبیعی کشور مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه برداری از برگ‌های جوان هر جمعیت به صورت Bulk صورت گرفت. گوناگونی ژنتیکی با استفاده از روش RAPD-PCR مورد مطالعه قرار گرفت. تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی با روش ماکزیمم پارسیمونی (*Maximum Parsimony*) با استفاده از نرم افزار PAUP× انجام شد. گونه‌هایی که در بررسی صفات ریخت‌شناسی شباهت زیادی با یکدیگر داشتند در این تحقیق نیز در مجاورت هم در یک کلاد قرار گرفتند. گونه‌های *M. rigidula* و *M. aculeala*، *M. constricta*، *M. rigiduloides* که با داشتن خار و دیواره سخت و یافت اسفنجی شباهت زیادی به هم دارند در این بررسی در کنار هم قرار گرفتند و گونه‌های *M. polymorpha* و *M. sauaegei*، *M. laciniata* با داشتن دیواره نرم و انعطاف‌پذیر در نیام نیز در یک کلاد قرار دارند، بنابراین تا حدودی با ویژگی‌های مورفولوژیک مطابقت نشان می‌دهند. همچنین با بررسی جمعیت‌های مربوط به یک گونه مشخص می‌شود که در مورد گونه‌هایی که پراکنش وسیع در ایران دارند جمعیت‌هایی از یک گونه که متعلق به مناطق آب و هوایی مجاور هم می‌باشند در این بررسی نیز در یک کلاد مجاور هم قرار می‌گیرند. از جمله می‌توان به گونه *M. minima* با پراکنش بسیار وسیع اشاره نمود که دو جمعیت خوزستانی و فارسی آن با شرایط آب و هوایی مشابه در مجاورت هم و جمعیت دیگر که متعلق به کرمانشاه است با فاصله بیشتری از آن قرار دارد. در مورد گونه *M. orbicularis* نیز جمعیت‌های مربوط به استان‌های کرمانشاه و لرستان مجاور هم و با ضریب اطمینان ۹۰ درصد و جمعیت بوشهری آن با شرایط آب و هوایی دیگر در فاصله بیشتری از این دو جمعیت قرار دارد. این مسئله نشان می‌دهد که تنوع ژنتیکی در مورد گونه‌های با گسترش زیاد از الگوی پراکنش جغرافیایی تبعیت می‌کند. در مجموع نتایج این تحقیق نشان دهنده کارایی نشانگرهای مولکولی در تعیین قرابت و خویشاوندی تاکسونها در سطح گونه و واحدهای تحت گونه‌های می‌باشد و می‌تواند به عنوان ابزار مکمل در شناسایی تاکسونومیک گونه‌های جنس یونجه استفاده گردد.

کلمات کلیدی: روابط خویشاوندی، نشانگر RAPD، یونجه

Pajouhesh & Sazandegi No:66 pp: 2-12

Phylogenetic relationships in Iranian medicago genus using RAPD marker

By: F. Ghanavati; Seed and Plant Improvement Institute, National Plant Genebank of Iran, Karaj, Iran

Mozafari J, Seed and Plant Improvement Institute, National Plant Genebank of Iran, Karaj, Iran

Safaei H, Zarghan Agricultur Researches Institute, Zarghan, Iran

Kazempour Osalu Sh, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran

Genetic diversity of 54 populations from 22 species of genus *Medicago* collected from Iranian natural habitat was studied. DNA was extracted from bulked leaf samples of each population and used for RAPD-PCR. RAPD marker produced by 11 UBC random primers was analyzed according to Maximum Parsimony method. Using the computer software PAUP (Swofford 2000) a phylogenetic tree with 5 main cluster was generated. Populations of *M. aculeala*, *M. constricta*, *M. rigiduloides* and *M. rigidula* with hard pod walls and spongy texture were classified in one cluster. Populations of *M. sauvagei*, *M. laciniata* and *M. polymorpha* which had soft and flexible pod walls were classified together in a separate cluster. Populations of each species were also classified together in subclusters indicating that RAPD marker were capable of identifying genetic diversity at the species level. Populations of one species grown under similar climatic conditions were grouped together under the cluster of that species. This indicates that genetic diversity correlates with geographical distribution of wide spread annual medic species in Iran. Results of this study showed that RAPD marker are applicable as a complementary tool in taxonomic identification of genus *Medicago* at both species and population levels.

KeyWords: Phylogenetic Relationships, *Medicago*, RAPD Marker**مقدمه**

۱۹۹۵ توسط Brummer و همکاران بررسی شده است. نتایج حاصله رده‌بندی کلاسیک را تأیید کرد و نشان داد که تنوع بین توده‌های *M. murex* و *M. scutellata* و *M. polymorpha* بالاتر است (۸). Vital و همکاران تنوع ژنتیکی جمعیت‌هایی از گونه *M. polymorpha* را به کمک نشانگر مولکولی RAPD بررسی کرده‌اند. در این تحقیق بیان شد که تنوع درون جمعیتی به ویژه در خصوصیات مولکولی و بیوشیمیایی آن بالاست (۲۱). در سال ۱۹۹۸ خویشاوندی ۴ گونه از زیربخش *Intertextae* شامل *M. ciliaris* و *M. intertexta*، *M. muricoletis*، *M. grandensis* توسط Rose و همکاران به کمک نشانگر مولکولی کلروپلاستی (CP DNA) بررسی گردید. نتایج نشان داد که دو گونه *M. ciliaris* و *M. grandensis* دارای *intertexta* مسیر تکاملی مشابهی بوده و گونه‌های *M. grandensis* و *M. muricoletis* در طی مسیر گونه‌زایی از گونه *M. intertexta* اشتقاق یافته‌اند (۱۶). Bena و همکاران در یک تحقیق جامع، فیلوژنی جنس یونجه را با استفاده از نشانگرهای مولکولی ITS^۲ و ETS^۵ مورد بررسی قرار داده‌اند. بر اساس نتایج این تحقیق، گونه‌های چندساله و دیگر لقاح برخلاف نظر سایر محققین مانند Lesins و Lesins، ابتدایی نبوده و به نظر می‌رسد در مسیر تکاملی ابتدا گونه‌های یکساله خودلقاح و سپس گونه‌های چندساله با سیستم تولیدمثلی دگرلقاحی تشکیل شده باشند و به کمک نشانگر مولکولی ETS، خویشاوندی ۱۳ گونه یکساله جنس را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه رده‌بندی Lesins و Lesins (۱۹۷۹) روی جنس را مورد تردید قرار می‌دهد و بیان می‌دارد که سه زیربخش *Rotatae* و *Pachyspirae*، *Leptospirae* و *Leptospirae* منوفیلتیک یا تک

جنس یونجه (*Medicago*) یکی از مهمترین لگوم‌های علوفه‌ای می‌باشد که در نواحی معتدله جهان پراکنش یافته‌اند (۱) این جنس مشتمل بر ۱۲ بخش است که ۵ بخش آن شامل *Medicago*، *Spirocarpos*، *Lupularia*، *Orbiculares* و *Hymenocarpos* در کشور ایران گسترش دارند (۱۴). در میان گونه‌های موجود در ایران دو گونه *M. lupulina* و *M. sativa* چند ساله می‌باشند که گونه *M. sativa* زراعی و در سطح وسیعی در کشور کشت می‌گردد. ۲۱ گونه دیگر موجود در ایران یکساله هستند. تنوع و تغییر در صفات مورفولوژیکی مبنای ژنتیکی ساده‌ای دارد و ممکن است دو جمعیت که فنوتیپ متفاوتی دارند از نظر ژنتیکی بسیار مشابه باشند حال آنکه در جمعیتی که از نظر فنوتیپی مشابه‌اند ممکن است از نظر ژنتیکی متفاوت و حاوی ژنهای مفیدی باشند (مثل مقاومت به استرس‌های محیطی) که از نظر اصلاح‌گران دارای ارزش زیادی است (۳).

از سوی دیگر در سال‌های اخیر استفاده از نشانگرهای مولکولی چشم‌انداز نویسی را برای ارزیابی تنوع فراهم آورده‌اند. با استفاده از این نشانگرها، امکان ارزیابی مستقیم تنوع در سطح ژنوم وجود دارد. از این رو دقت این نشانگرها به دلیل استفاده مستقیم از ماده وراثتی بسیار بالاست. از جمله نشانگرهای مبتنی بر PCR^۱، RFLP^۲، و RAPD^۳ هستند که جهت تشخیص تنوع و تغییرات بین جمعیت‌ها و گونه‌ها مفید می‌باشند (۲). Brummer و همکاران، Echt و همکاران و Yu و Pauls تنوع بین جمعیت‌ها و گونه‌های یونجه چند ساله را با کمک نشانگرهای مولکولی RFLP و RAPD بررسی نموده‌اند (۷، ۱۰، ۲۲). تنوع ژنتیکی یونجه‌های یکساله به کمک نشانگر مولکولی RAPD در سال

استخراجی غلظت‌های یکسان $25 \text{ ng}/\mu\text{l}$ تهیه و در دمای 20°C - درجه سانتیگراد نگهداری شد.

RAPD-PCR

جهت انجام آزمایش RAPD، آغازگر^۷ ده نوکلئوئیدی از سری کامل آغازگرهای تصادفی دانشگاه بریتیش کلمبیای کانادا (UBC) مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۲). آزمایش RAPD-PCR در واکنشهای 25 mm dNTP ; 1.6 mm MgCl_2 ; $2 \text{ U Taq } (200)$ میکرولیتری شامل اجزاء (PCR-buffer; $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ Primer $1 \mu\text{M}$ ؛ DNA Polymerase) صورت گرفت و 25 ng نانوگرم DNA به هر واکنش اضافه گردید. پس از آماده کردن هر واکنش، نمونه‌ها به مدت 20 ثانیه در 7700 دور در دقیقه سانتریفوژ شدند و سپس به هر کدام 25 میکرولیتر روغن معدنی اضافه و در ماشین PCR قرار گرفتند. سیکل‌های حرارتی اعمال شده شامل مرحله واسرشته سازی اولیه^۸ 4 دقیقه در 94°C درجه سانتیگراد؛ 35 سیکل شامل (مرحله واسرشته سازی^۹ یک دقیقه در 94°C درجه سانتیگراد، مرحله اتصال^{۱۰} آغازگر به رشته الگو یک دقیقه در 35°C درجه سانتیگراد، مرحله بسط^{۱۱} توسط پلیمرز 2 دقیقه در 70°C درجه سانتیگراد؛ مرحله بسط نهایی^۶ دقیقه در 70°C درجه سانتیگراد می‌بود. محصولات PCR بر روی ژل $1/5$ درصد آگارز بارگذاری و الکتروفورز شدند. برای تعیین اندازه باندها از سایز مارکر^{۱۲} (1 kb) استفاده شد. پس از رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید، کار رنگ‌زدایی توسط آب مقطر به مدت 30 دقیقه انجام و سپس از ژل تهیه شده عکس برداری شد. به منظور تست تکرارپذیری واکنش‌ها، آزمایشات RAPD-PCR دو بار انجام شدند.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تصاویر تهیه شده از ژل‌های الکتروفورز محصولات RAPD-PCR که در آن قطعات تکثیر یافته توسط هر آغازگر به صورت باندهایی از هم تفکیک شده بودند، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. بررسی حضور (۱) یا عدم حضور باندها (۰) به وسیله بازخوانی مقادیر کامپیوتری ژل‌ها در برنامه Photocapt Mw انجام شد. تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی از روش ماکزیم پارسیمونی با استفاده از نرم‌افزار PAUP \times انجام شد (۲۰). در این روش از الگوریتم Heuristic تحت دستورات زیر استفاده شد. صفات هم وزن^{۱۳} و unordered با 100 تکرار تصادفی از تاکسونها و جاروب کردن شاخه^{۱۴} با روش قطع دوتایی و اتصال مجدد درخت^{۱۵} TBR و حفظ 5 درخت در هر گام به کار برده شدند (۱۳). سپس آنالیز Bootstrap برای بدست آوردن حدود اطمینان کلادهای مورد نظر با 100 تکرار انجام گردید (۱۲). در روش ماکزیموم پارسیمونی تجزیه و تحلیل Bootstrap متعاقب و وزن‌گذاری مجدد صفات^{۱۶} و بر اساس اندکس^{۱۷} RC انجام شد (۱).

نتایج

۱۱ آغازگر تصادفی بر روی 54 جمعیت از 22 گونه Medicago آزمایش شد. الگوهای باندهای هر آغازگر در شکل‌های ۱ تا ۴ نشان داده شده است. نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که ۱۱ آغازگر تصادفی مورد استفاده منجر به تکثیر 195 لوکوس قابل نمره‌گذاری شدند که در بین آنها 170 لوکوس (85% لوکوس‌ها) در تمام توده‌ها چند شکلی خوبی را نشان داد. تعداد قطعات چند شکلی تولید شده با هر آغازگر و در هر جمعیت

تباری می‌باشند. گونه‌های *M. murex* و *M. tornata* از زیر بخش Pachyspirae با داشتن دیواره سخت نیام و عدم وجود رگبندی در سطح حلقه، مختلط با گونه *M. rotata* و *M. noeana* از زیربخش Rotatae و یا *M. praecox* از زیر بخش Leptospirae، بیانگر سیر تکاملی مشابه این سه زیربخش می‌باشد (۵، ۶، ۱۵). همچنین در سال 1998 ، این محققین در پژوهش دیگری عنوان کرده‌اند که نتایج فیلوژنی مولکولی حاصل از نشانگرهای ITS و ETS، حاکی از تعلق داشتن گونه *M. radiata* به جنس یونجه می‌باشد در حالیکه Small در سال 1980 ، نظریه نزدیکی این گونه را به جنس *Trigonella* مطرح کرده است و نیز گاهی بیان شده است که این گونه حدواسط دو جنس فوق می‌باشد (۴، ۱۸، ۱۹). Bena و همکاران بیان کرده‌اند که تناقض‌هایی بین مطالعات فیلوژنی مولکولی و رده‌بندی کلاسیک در جنس یونجه وجود دارد که باید به آن پرداخته شود (۶).

در این تحقیق تنوع بین جمعیت‌ها و گونه‌های جنس Medicago در سطح DNA با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD جهت برنامه‌های اصلاحی بررسی و روابط خویشاوندی گونه‌ها تعیین می‌شود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

تعداد 54 جمعیت از 22 گونه جنس یونجه شامل

M. radiata. *M. orbicularis*. *M. sativa*. *M. lupulina*.
M. constricta. *M. rigidula*. *M. rigiduloides*. *M. turbinata*.
M. truncatula. *M. minima*. *M. aculeata*. *M. littoralis*.
M. noeana. *M. rugosa*. *M. scutellata*. *M. tornata*. *M. arabica* و *laciniata*. *M. saugei*. *M. polymorpha*

که از رویشگاه‌های طبیعی کشور جمع‌آوری و در کلکسیون بانک ژن گیاهی ملی ایران نگهداری شده‌اند مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱). از هر جمعیت حد اقل 50 عدد بذر پس از شستشو و ضدعفونی با قارچکش بنومیل در 3 تکرار و در گلدانهای پلاستیکی و در عمق 2 سانتیمتری خاک، با ترکیب ماسه‌بادی، خاک برگ و خاک مزرعه به نسبت $1:1:2$ در آبان ماه 1381 در گلخانه بانک ژن گیاهی ملی ایران کشت شدند و در مقابل آفات و بیماری‌ها کنترل شدند. نمونه‌برداری از برگ‌های جوان هر جمعیت به صورت Bulk صورت گرفت و در نیتروژن مایع منجمد شده و سریعاً به سردخانه با دمای -70°C درجه سانتیگراد منتقل شدند.

استخراج DNA

استخراج DNA از نمونه‌های برگی با استفاده از روش Dellaporta و همکاران انجام گرفت (۹). برای تعیین کیفیت، DNA ژنومی استخراج شده بر روی ژل 0.8% درصد آگارز بارگذاری شدند. حضور تک باند شفاف با وزن مولکولی بالا نشانه DNA سالم و تجزیه نشده تلقی گردید. برای بررسی کمیت و غلظت DNA استخراجی از دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد و برای این کار نسبت جذب $280 \text{ OD} / 260 \text{ OD}$ اندازه‌گیری شد. چنانچه این نسبت در حدود $2-1.8$ می‌بود، DNA استخراجی از کیفیت مطلوبی برخوردار بوده و انتخاب گردیدند (۱۷). پس از محاسبه غلظت DNA برای هر نمونه، جهت انجام آزمایشات RAPD-PCR، از کلیه نمونه‌های

جدول ۱- سطح بلندی و مشخصات محل جمع آوری جمعیت‌های مورد مطالعه

شماره	گونه	سطح بلندی	محل جمع آوری	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	ارتفاع	اقلیم
۱	<i>M. sauvagei a</i>	۲۸ = ۱۶	خوزستان: کیلومتر ۲۰ جاده آغاخاری به بهبهان	۴۹	۳۰	۴۰۰	۹
۲	<i>M. sauvagei b</i>	۲۸ = ۱۶	خوزستان: کیلومتر ۱۰ جاده اهواز به راهپونز	۴۸	۳۱	۹۰	۸
۳	<i>M. sauvagei c</i>	۲۸ = ۱۶	خوزستان: اهواز، گمبوه	۴۸	۳۱	۱۸	۸
۴	<i>M. laciniata a</i>	۲۸ = ۱۶	پوشهر: تنگستان، خائیز	۵۱	۲۸	۶۰	۹
۵	<i>M. laciniata b</i>	۲۸ = ۱۶	فارس: دریاچه پریشان، نوشین جان، قرمزشیان	۵۱	۲۹	۹۷۰	۹
۶	<i>M. laciniata c</i>	۲۸ = ۱۶	خوزستان: اندیشک	۴۸	۳۲	۱۲۰	۸
۷	<i>M. polymorpha a</i>	۲۸ = ۱۴	مازندران: کلاردشت	۵۱	۳۶	۱۴۴۰	۹
۸	<i>M. polymorpha b</i>	۲۸ = ۱۴	خوزستان: امیدیه، بزی	۴۹	۳۰	۱۱۰	۹
۹	<i>M. polymorpha c</i>	۲۸ = ۱۴	پوشهر: دشتی، خورموج	۵۱	۲۸	۶۰	۹
۱۰	<i>M. orbicularis a</i>	۲۸ = ۱۶	پوشهر: دشتستان، تنگ فاراب	۵۱	۵۱	۴۰۰	۹
۱۱	<i>M. orbicularis b</i>	۲۸ = ۱۶	کرمانشاه: سرپل ذهاب، سراب گرم	۴۴	۳۴	۷۰۰	۱۱
۱۲	<i>M. orbicularis c</i>	۲۸ = ۱۶	لرستان: الشتر، ورنخان	۴۸	۳۳	۱۴۵۰	۱۰
۱۳	<i>M. minima a</i>	۲۸ = ۱۶	خوزستان: بهبهان، کنار رودخانه مارون	۵۰	۳۰	۲۸۰	۹
۱۴	<i>M. minima b</i>	۲۸ = ۱۶	فارس: کلاردون، کتل بیرون	۵۲	۲۹	۱۷۰۰	۹
۱۵	<i>M. minima c</i>	۲۸ = ۱۶	کرمانشاه: سرپل ذهاب، سراب گرم	۴۴	۳۴	۷۰۰	۱۱
۱۶	<i>M. tornata a</i>	۲۸ = ۱۶	کرمانشاه: یستون، نجوران	۴۷	۳۴	۱۴۲۰	۱۱
۱۷	<i>M. tornata b</i>	۲۸ = ۱۶	کرمانشاه: کرد غرب، سرخه دیزه	۴۶	۳۴	۱۴۴۰	۱۱
۱۸	<i>M. tornata c</i>	۲۸ = ۱۶	کرمانشاه: اسلام آباد غرب، ترارک	۴۷	۳۳	۱۵۰۰	۱۱
۱۹	<i>M. arabica a</i>	۲۸ = ۱۶	گلستان: آق‌قلا، مرزن کلا	۴۱	۳۷	۸۰	۱۱
۲۰	<i>M. arabica b</i>	۲۸ = ۱۶	گلستان: گرگان، توسکستان	۵۴	۳۶	۸۶۰	۱۲
۲۱	<i>M. constricta a</i>	۲۸ = ۱۴	کرمانشاه: قصر شیرین	۴۵	۳۴	۳۵۰	۱۲
۲۲	<i>M. constricta b</i>	۲۸ = ۱۴	خوزستان: دزفول، جزیره پشت سد دز	۴۸	۳۲	۲۰۰	۸

شماره	گونه	سطح بلوریدی	محل جمع آوری	طول جنس‌افزایی	عرض جنس‌افزایی	ارتفاع	القیب
۲۳	<i>M. constricta c</i>	$2n = 14$	خوزستان: مسجد سلیمان، اندیکا	۴۹	۲۲	۴۸۰	۹
۲۴	<i>M. aculeata a</i>	$2n = 16$	خوزستان: مسجد سلیمان، قاسم آباد	۴۹	۲۲	۴۹۰	۹
۲۵	<i>M. aculeata b</i>	$2n = 16$	کرمانشاه: سرپل ذهاب، سراب گرم	۴۵	۲۴	۷۰۰	۱۱
۲۶	<i>M. scutellata a</i>	$2n = 20$	بوشهر: دشتستان، تنگ زرد	۵۱	۲۸	۴۶۰	۹
۲۷	<i>M. scutellata b</i>	$2n = 20$	خوزستان: دزفول، جزیره پشت سد دز	۴۸	۲۲	۴۵	۸
۲۸	<i>M. turbinata a</i>	$2n = 16$	کرمانشاه: سرپل ذهاب، سراب گرم	۴۵	۲۴	۷۰۰	۱۱
۲۹	<i>M. turbinata b</i>	$2n = 16$	خوزستان: مسجد سلیمان، اندیکا	۴۹	۲۲	۴۸۰	۹
۳۰	<i>M. turbinata c</i>	$2n = 16$	بوشهر: تنگستان، حائیز	۵۱	۲۸	۶۰	۹
۳۱	<i>M. truncatula a</i>	$2n = 16$	فارس: کازرون، چنار شاه‌بیجان	۵۱	۲۹	۸۱۰	۹
۳۲	<i>M. truncatula b</i>	$2n = 16$	خوزستان: ۱۵ کیلومتری اهواز به راهپیمز	۴۸	۳۱	۲۰	۸
۳۳	<i>M. noeana a</i>	$2n = 16$	کرمانشاه: سه راهی شیابان	۴۶	۲۴	۱۴۵۰	۱۱
۳۴	<i>M. noeana b</i>	$2n = 16$	لرستان: الشتر، رسله	۴۸	۳۳	۱۵۰۰	۱۰
۳۵	<i>M. noeana c</i>	$2n = 16$	آذربایجان غربی: تیسرو تپیک	۴۴	۳۷	۱۶۰۰	۵
۳۶	<i>M. ciliaris</i>	$2n = 18$	خوزستان: بهمان، رودخانه مارون	۵۰	۳۰	۲۸۰	۹
۳۷	<i>M. coronata a</i>	$2n = 16$	کرمانشاه: سرپل ذهاب، سراب گرم	۴۵	۲۴	۷۰۰	۱۱
۳۸	<i>M. coronata b</i>	$2n = 16$	قزوین: الموت، واژبیان	۵۰	۳۲	۱۰۶۰	۱۰
۳۹	<i>M. coronata c</i>	$2n = 16$	خوزستان: سه راهی مسجد سلیمان، اهواز	۴۹	۳۱	۱۱۰	۹
۴۰	<i>M. littoralis a</i>	$2n = 16$	گلستان: گلبه، دره بش آیلان	۵۵	۳۷	۱۴۰	۱۱
۴۱	<i>M. littoralis b</i>	$2n = 16$	بوشهر: تنگستان، حائیز	۵۱	۲۸	۶۰	۹
۴۲	<i>M. littoralis c</i>	$2n = 16$	بوشهر: دشتی، خورموج	۵۱	۲۸	۶۰	۹
۴۳	<i>M. radiata a</i>	$2n = 16$	لرستان: درود، دره زان	۴۹	۳۳	۱۶۰۰	۵
۴۴	<i>M. radiata b</i>	$2n = 16$	خراسان: کلان، چنگل خواجه	۵۹	۳۷	۷۰۰	۹
۴۵	<i>M. radiata c</i>	$2n = 16$	همدان: نهاوند، سراب کیان	۴۸	۳۴	۲۱۷۰	۵

گونه‌های ۲۰-۵ عدد و دامنه اندازه قطعات تکثیر شده ۱۰۰-۳۵۰bp بود. همه گونه‌ها تعداد مشابهی باند در هر آغازگر داشتند و از این جهت تفاوتی بین گونه‌ها مشاهده نشد. این مسئله از این جهت حائز اهمیت است که ۳ گونه *M. sativa* و *M. rugosa* و *M. scutellata* که تتراپلوئید و دارای ۳۰ و ۳۲ کروموزوم می‌باشند باند بیشتری نسبت به گونه‌های دیپلوئید ۱۶ و ۱۴ کروموزومی نداشتند.

نتایج آنالیز کلادیستیک به روش ماکزیمم پارسیمونی ۶ درخت فیلوژنی در یک جزیره به طول ۶۳۲ و $CI^{18} = 0/147$ و $RI^{19} = 0/658$ و $RCI^{20} = 0/097$ را مشخص نمود که درخت^{۲۱} آن در شکل شماره ۵ آمده است. در این درخت به دلیل همپلازی بالا بسیاری از انشعابات Collapsed بوده، بنابراین پس از وزن‌گذاری مجدد صفات براساس RCI و با ۱۰۰ تکرار، یک درخت فیلوژنی نهایی با ضریب اطمینان بالای ۵۰٪ مطابق شکل شماره ۶ به دست آمد. براساس تحقیقات Small و همکاران و Bena و همکاران و بررسی‌های فنوتیکی، در این تحقیق گونه *M. radiata* به عنوان Outgroup در نظر گرفته شد (۵، ۱۸). براساس کلادوگرام حاصل ۵ کلاد اصلی می‌توان در آن در نظر گرفت، همه کلادها با ضریب اطمینان ۱۰۰ درصد از یکدیگر تفکیک می‌شوند. پائین‌ترین کلاد مجاور *M. radiata* متعلق به جمعیت‌های *M. minima* است که دو جمعیت خوزستانی و فارسی آن با ضریب اطمینان ۹۰ درصد در مجاور هم به یک کلاد انتهایی تعلق دارند و جمعیت کرمانشاهی این گونه با ضریب اطمینان ۱۰۰ درصد به عنوان sister دو جمعیت دیگر است.

در کلاد دیگر گونه‌های *M. rugosa* و *M. ciliaris* به همراه جمعیت‌هایی از گونه *M. coronata* قرار دارد. جمعیت‌های قزوینی و خوزستانی *M. coronata* با ضریب اطمینان ۷۷ درصد در مجاور هم در یک کلاد انتهایی و جمعیت کرمانشاهی آن با ضریب اطمینان ۱۰۰ درصد sister دو جمعیت دیگر است. در کلاد سوم گونه‌های *M. aculeata*، *M. orbicularis*، *M. rigiduloides*، *M. rigidula*، *M. constricta*، *M. arabica* قرار دارند. در این میان دو جمعیت کرمانشاهی و لرستانی *M. orbicularis* با ضریب اطمینان ۹۰ درصد در مجاور هم در یک زیرکلاد انتهایی قرار دارد که با ۱۰۰ درصد اطمینان در مجاور جمعیت بوشهری این گونه می‌باشد. و دو جمعیت *M. arabica* با اطمینان ۱۰۰ درصد در مجاورت هم می‌باشند. جمعیت‌های *M. constricta* که از دزفول خوزستان و قصرشیرین کرمانشاه جمع‌آوری شده بودند با ضریب اطمینان ۸۲ درصد در یک کلاد و با اطمینان ۱۰۰ درصد در مجاورت جمعیت اندیکایی این گونه می‌باشند. دو گونه *M. rigidula* و *M. rigiduloides* از نظر ویژگی‌های ریخت‌شناسی مشابه همدیگر می‌باشند در این بررسی نیز در مجاورت هم قرار دارند ضمن اینکه در این میان جمعیت‌های *M. rigidula* با اطمینان ۵۱ درصد در مجاور هم در یک کلاد و دو جمعیت *M. rigiduloides* نیز با ضریب اطمینان ۶۲ درصد در کنار هم قرار دارند و کاملاً جدا از *M. rigidula* می‌باشند. تنها جمعیت کهگیلویه و بویراحمدی گونه *M. rigiduloides* در یک sister مجاور دو کلاد مربوط به این ۲ گونه می‌باشد و حائز اهمیت است. جمعیت‌های *M. aculeata* نیز با ضریب اطمینان ۷۶ درصد در مجاور هم در یک کلاد می‌باشند. کلاد چهارم متشکل از گونه‌های *M. truncatula*، *M. littoralis* و *M. sativa*، *M. lupulina*، *M. scutellata* گونه‌های چند ساله *M. sativa* و *M. lupulina* در میان گونه‌های یکساله

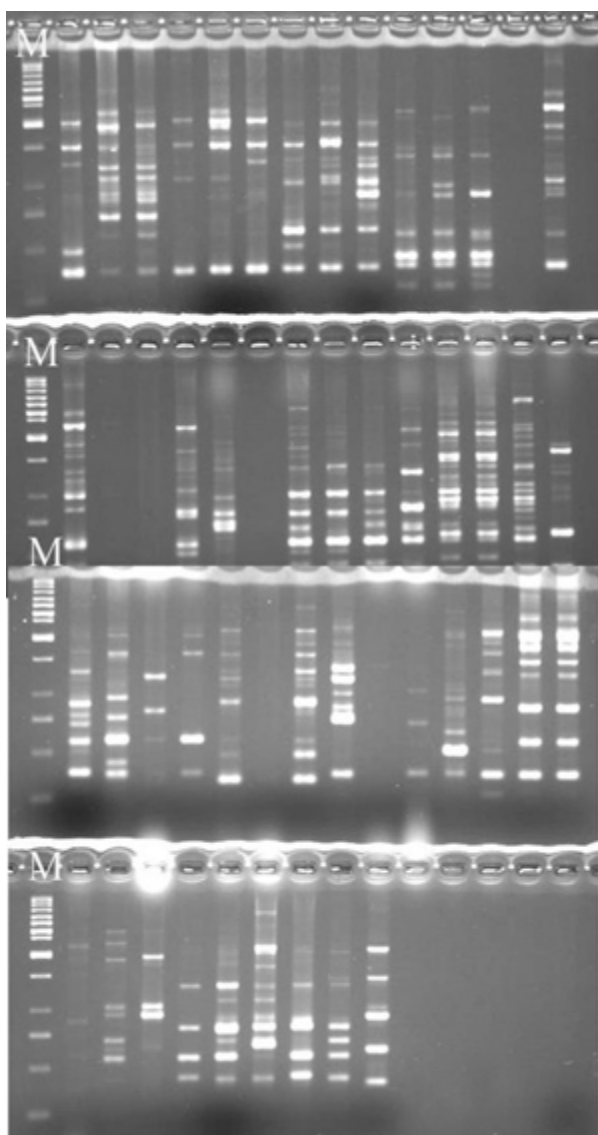
ادامه جدول ۱

شماره	گونه	سطح بلوریدی	محل جمع‌آوری	طول جنرایی	عرض جنرایی	ارتفاع	انقسام
۴۶	<i>M. rigiduloides a</i>	$2n = 14$	محل جمع‌آوری	۴۹	۳۰	۱۰۰	۹
۴۷	<i>M. rigiduloides b</i>	$2n = 14$	محل جمع‌آوری	۴۷	۳۴	۱۴۵۰	۵
۴۸	<i>M. rigidula a</i>	$2n = 14$	محل جمع‌آوری	۴۷	۳۳	۱۵۰۰	۱۱
۴۹	<i>M. rigidula b</i>	$2n = 14$	محل جمع‌آوری	۵۴	۳۷	۷۰۰	۹
۵۰	<i>M. rigiduloides c</i>	$2n = 14$	محل جمع‌آوری	۵۱	۳۰	۱۷۴۰	۳
۵۱	<i>M. rugosa a</i>	$2n = 20$	محل جمع‌آوری	۴۸	۳۱	۲۰	۸
۵۲	<i>M. lupulina</i>	$2n = 16$	محل جمع‌آوری	۵۴	۳۷	۲۲۰۰	۹
۵۳	<i>M. sativa a</i>	$2n = 32$	محل جمع‌آوری	۵۴	۳۶	۱۷۸۰	۲
۵۴	<i>M. sativa b</i>	$2n = 32$	محل جمع‌آوری	۵۱	۲۸	۴	۹

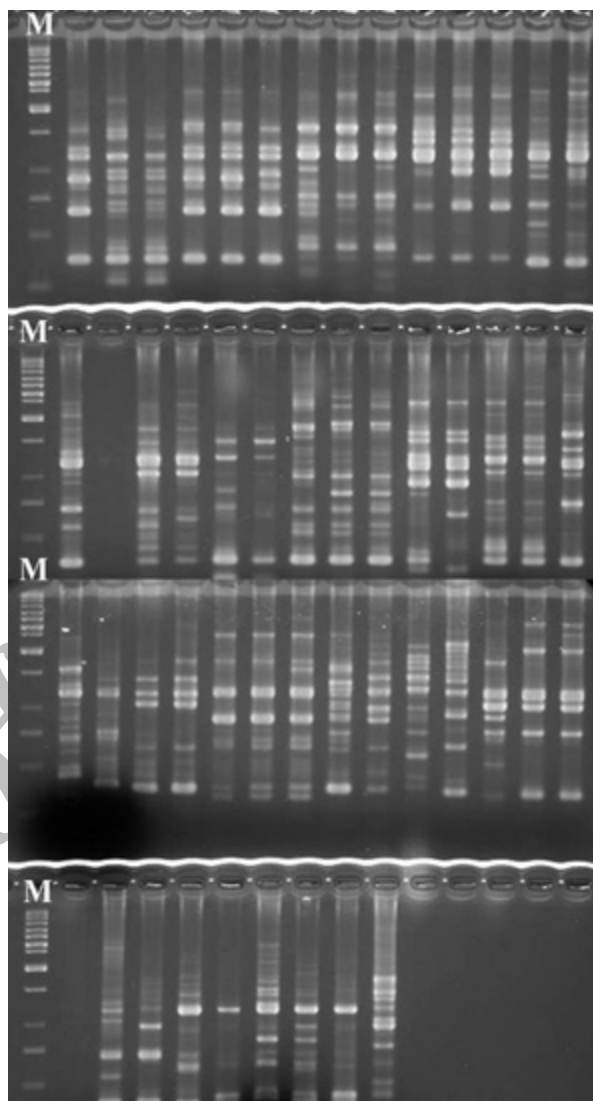
صورت sister گونه *M. polymorpha* می‌باشد.

بحث

نتایج حاصل از تحقیق به عمل آمده بر روی گونه‌های *Medicago* نشانگر یافته‌های جدیدی بر روی خویشاوندی گونه‌های این جنس است. به طوری که در کلاد وگرام شکل ۶ مشاهده می‌گردد گونه‌های چند ساله *M. sativa* و *M. lupulina* با ضریب اطمینان بالا در مجاور هم و در میان گونه‌های یکساله جای گرفته‌اند. این نتیجه تکامل موازی گونه‌های یکساله *Medicago* را نشان می‌دهد و مؤید این مطلب است که گونه‌های یکساله به صورت موازی تکامل یافته‌اند و چند ساله بودن الزاماً یک صفت نیایی محسوب نمی‌گردد. و نتایج این بررسی با بررسی فیلوژنتیک براساس صفات

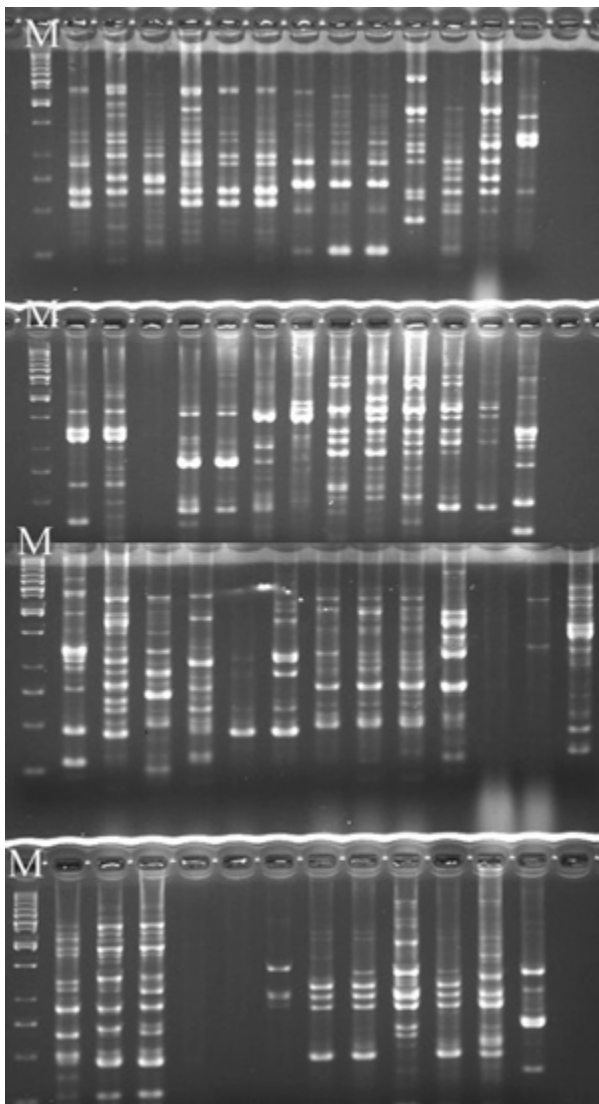


شکل شماره ۲- الگوهای بانندی آغازگر ۲۶۲ UBC



شکل شماره ۱- الگوهای بانندی آغازگر ۲۸۵ UBC

حائز اهمیت است. در این میان دو جمعیت از گونه *M. scutellata* با ضریب اطمینان ۱۰۰ درصد در مجاورت هم هستند. دو جمعیت بوشهری گونه *M. littoralis* با ضریب اطمینان ۷۵ درصد در مجاور هم و در کنار جمعیت گلستانی این گونه قرار دارند. در کلاد پنجم گونه‌های *M. tornata*، *M. sauvagei* و *polymorpha*، *M. turbinata*، *M. noeana*، *M. laciniata* قرار دارند. دو گونه *M. laciniata* و *M. sauvatgei* از نظر مورفولوژیکی شباهت بسیار زیادی با هم دارند در این کلاد وگرام مجاور هم ولی کاملاً مجزا می‌باشد و با ضریب اطمینان ۹۷ درصد در یک کلاد قرار می‌گیرند. و جمعیت‌های گونه *M. noeana* با ضریب اطمینان ۵۴ درصد در مجاورت دو گونه مذکور است جمعیت‌های کرمانشاهی و بوشهری *M. turbinata* کاملاً مجاور هم در یک کلاد قرار داشته در حالی که جمعیت خوزستانی آن به

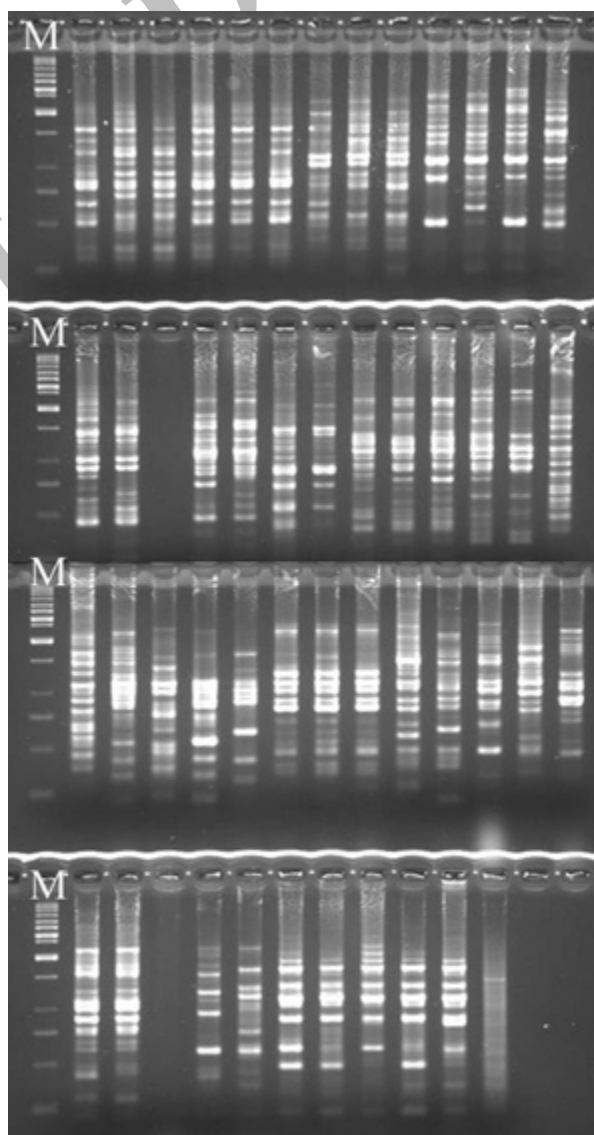


شکل شماره ۴- الگوهای باندهای آغازگر UBC۵۶

مفیدی در جهت تعیین خویشاوندی و تفکیک بهتر جمعیت‌ها در گونه‌های گیاهی محسوب می‌شود به طوری که شناسایی گونه‌های نزدیک به هم را تسهیل می‌کند. کلادوگرام حاصل نشان می‌دهد که دو گونه *M. laciniata* و *M. sauvagei* اگرچه دارای ساختار ظاهری بسیار نزدیکی می‌باشند و از نظر پراکنش جغرافیایی نیز مشابه می‌باشند و با وجود اینکه از نظر الگوی باندهای تولید شده نیز به هم نزدیک می‌باشند اما دو تاکسون مستقل می‌باشند که با اطمینان ۹۷ درصد از هم تفکیک می‌شوند و با اطمینان می‌توان گونه *M. sauvagei* را از *M. laciniata* تفکیک و بر اساس این تحقیق برای اولین بار از ایران گزارش می‌دهد. همچنین گونه *M. tornata* که از نظر مورفولوژیکی مشابه گونه *M. littoralis* و *M. polymorpha* است بر اساس نشانگر مولکولی RAPD در کلادی متفاوت با گونه *M. littoralis* قرار گرفته و مستقل بودن آن به این وسیله تأیید می‌شود. دو گونه *M. rigidula*

ریخت‌شناسی و DNA ریپوزمی کاملاً منطبق است و تأیید می‌گردد. Lesins و Lesins در سال ۱۹۷۹ بر اساس صفات دوره رویشی و سیستم لقاحی بیان داشته‌اند که گونه‌های نیایی جنس *Medicago* عمدتاً گونه‌های چندساله و دگرلقاح هستند و معتقدند که گونه‌های یکساله و خودلقاح در مسیر تکامل از گونه‌های چندساله مشتق شده‌اند در حالی که در این تحقیق تکامل موازی این جنس تأیید می‌شود.

بر اساس کلادوگرام حاصل همه جمعیت‌های مربوط به یک گونه به جز گونه‌های *M. rigiduloides* و *M. turbinata* مشابه و در یک کلاد قرار می‌گیرند. بنابراین نشانگر RAPD قادر به تفکیک و جداسازی جمعیت‌های یک گونه می‌باشد و حدود گونه‌ها را به خوبی مشخص می‌نماید و ابزار



شکل شماره ۳- الگوهای باندهای آغازگر UBC۱۷

شکل شماره ۵- یکی از ۶ درخت حاصل از آنالیز فیلوژنی داده‌های RAPD

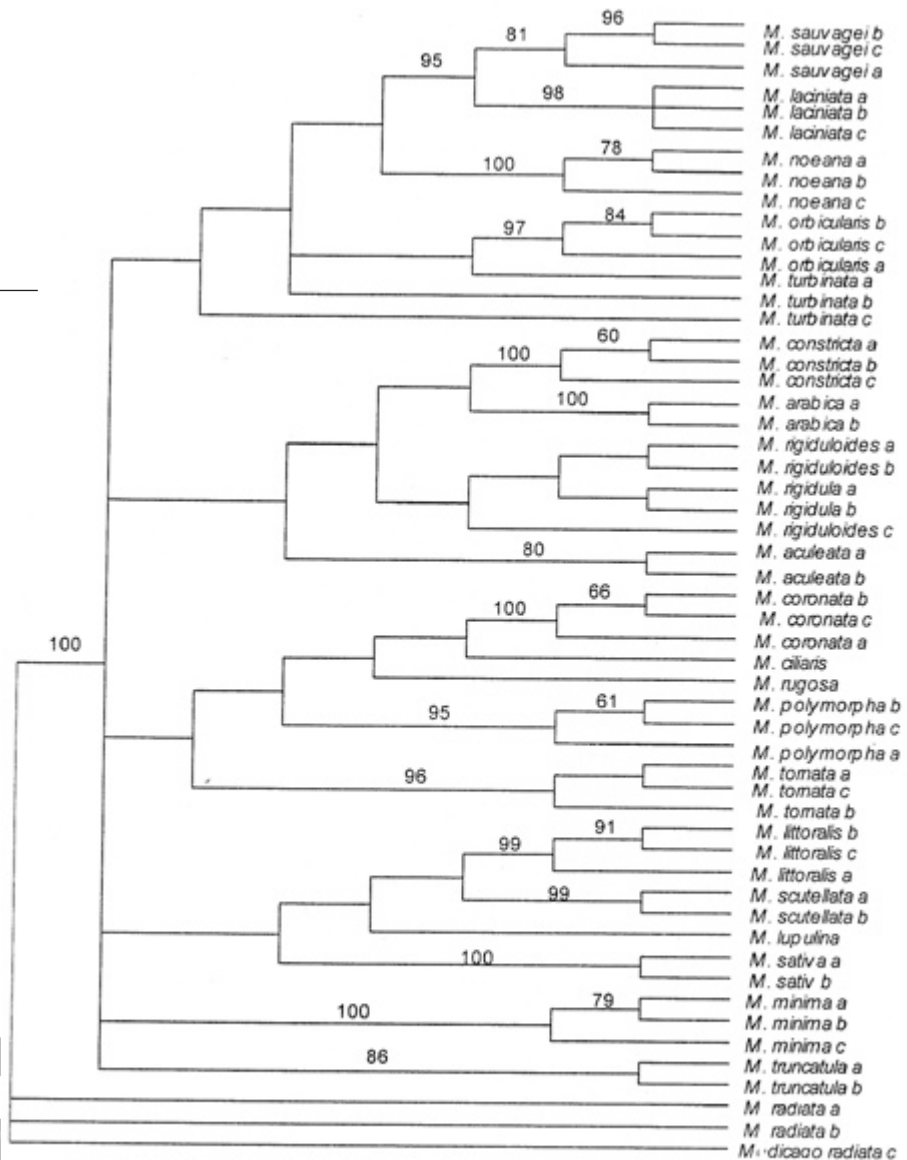


Fig. Strict consensus of six most parsimonious trees resulting from phylogenetic analysis of RAPD data (CI=0.147, RI=0.658, RC=0.097), bootstrap values over 50% are shown on branches (100 replications). The letters a, b and c on the right side of species name denote accessions.

همچنین نتایج نشان می‌دهد که گونه‌هایی که در بررسی صفات ریخت‌شناسی شباهت زیادی با یکدیگر دارند در این تحقیق نیز در مجاورت هم در یک کلاد قرار دارند از جمله گونه‌های *M. aculeata*, *M. constricta* و *M. rigidula* که با داشتن خار و دیواره سخت و بافت اسفنجی شباهت زیادی به هم دارند در این بررسی نیز در کنار هم قرار گرفته‌اند و گونه‌های *M. sauvagei* و *M. laciniata* با داشتن دیواره نرم و انعطاف‌پذیر در نیام در یک کلاد مجزا قرار دارند، بنابراین تا حدودی با ویژگی‌های مورفولوژیک مطابقت نشان می‌دهند. همچنین با بررسی جمعیت‌های مربوط به یک گونه مشخص می‌شود که در مورد گونه‌هایی که پراکنش وسیع در ایران دارند جمعیت‌هایی از یک گونه که متعلق به مناطق آب و هوایی مجاور هم می‌باشند در این بررسی نیز در یک کلاد و مجاور هم قرار می‌گیرند. از جمله می‌توان به گونه *M. minima* با پراکنش بسیار وسیع اشاره نمود که دو جمعیت خوزستانی و فارسی آن با شرایط آب و هوایی مشابه در مجاورت هم و جمعیت دیگر که متعلق به کرمانشاه است با فاصله بیشتری از آن قرار دارد. در مورد گونه *M. orbicularis* نیز جمعیت‌های مربوط به استان‌های کرمانشاه و لرستان مجاور هم و با ضریب اطمینان ۹۰ درصد و جمعیت بوشهری آن با شرایط آب و هوایی دیگر در فاصله بیشتری از این دو جمعیت قرار دارد. این مسئله نشان می‌دهد که تنوع ژنتیکی در مورد گونه‌های با گسترش زیاد از الگوی پراکنش جغرافیایی تبعیت می‌کند. در مجموع نتایج این تحقیق نشان دهنده کارایی نشانگرهای مولکولی در تعیین قرابت و خویشاوندی تاکسون‌ها در سطح گونه و واحدهای تحت گونه‌های می‌باشد و می‌تواند به عنوان ابزار مکمل در شناسایی تاکسونومیک گونه‌های جنس یونجه استفاده گردد.

و *M. rigiduloides* از نظر ویژگی‌های رویشی و زایشی بسیار مشابه می‌باشند و به سختی قابل تفکیک می‌باشند در این بررسی مشخص می‌شود که دو جمعیت *M. rigidula* کاملاً به یک کلاد تعلق داشته و دو جمعیت مربوط به همدان و خوزستان گونه *M. rigiduloides* در یک کلاد اما جمعیت یاسوجی آن مستقل از دو کلاد این دو گونه است و به صورت sister با اطمینان ۵۴ درصد در مجاورت آنها است و به نظر می‌رسد از نظر ویژگی‌های ژنتیکی با این دو گونه تفاوتی دارد. بنابراین جهت برنامه‌های اصلاحی حائز اهمیت می‌باشد. همچنین یک جمعیت از گونه *M. turbinata* که از استان خوزستان جمع‌آوری شده است کاملاً مستقل از دو جمعیت دیگر آن است و تفاوت‌های زیادی را با آن دو نشان می‌دهد.

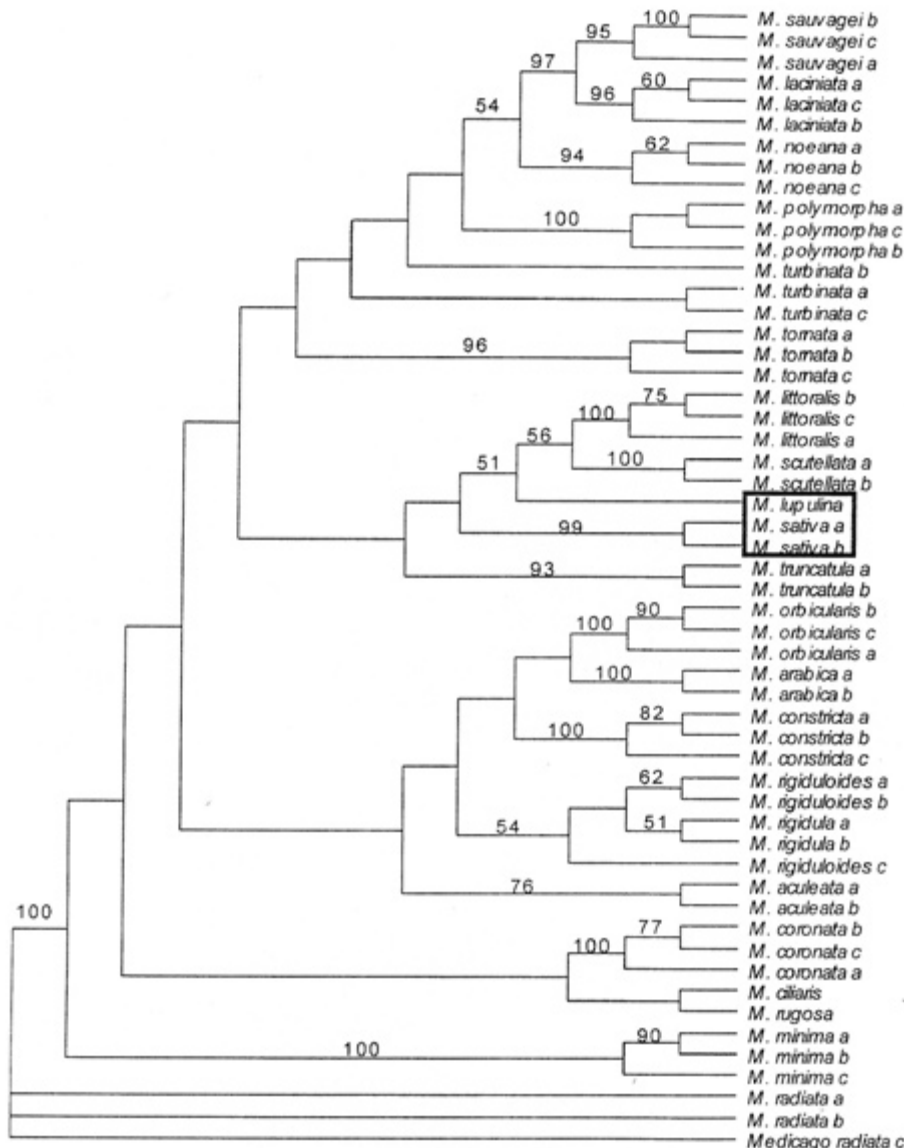


Fig. A single most parsimonious tree after successive weighting by rescaled consistency index. bootstrap values over 50% are shown on branches (100 replications). The letters a, b and c on the right side of species name denote accessions.

مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع.

4-Ali, ST., 1963. Typification of the genus medicago and some of its Linnean species. Taxon. 17: 540-541.

5-Bena, G., JM., Prosperi, B. Lejeune, I. Olivieri, 1999; Evolution of annual species of the genus medicago. A molecular phylogenetic Approach, Molecular Phylogenetic and evolution, 9(3): 552-559.

6-Bena, G., Jubier, M. F., Olivieri, I. & Lejeune, B. 1999 a, Ribosomal external and internal transcribed spacers: Combined use in the phylogenetic analysis of medicago (Leguminosae). J. Moiec. Exol. 46, 299-306.

شکل شماره ۶- درخت حاصل از داده‌های RAPD پس از وزن گذاری صفات

پاورقی‌ها

- 1- Polymerise Chain Reaction
- 2- Restriction Fragment Length Polymorphisms
- 3- Randomly Amplified Polymorphic DNA
- 4 - Internal Transcribed Spacer
- 5 - External Transcribed Spacer
- 6 - Optical Density
- 7 - Primer
- 8 - Initial Denaturation (hot start)
- 9- Denaturation
- 10 - Annealing
- 11 - Extension
- 12 - ladder
- 13 - Equal weighting
- 14 - Branch Swapping
- 15 - Tree Bisection Reconnection
- 16 - Reweighting
- 17 - Rescaled Consistency
- 18 - Consistency Index
- 19 - Retention Index
- 20 - Rescaled Consistency Index
- 21 - Strict

منابع مورد استفاده

- ۱ - حیدری شریف‌آباد، حسین و احمد ترک‌نژاد، ۱۳۷۹؛ یونجه‌های یکساله (کلیات). انتشارات مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، شماره ۲۴۹ تهران.
- ۲ - فلاحتی محسن، ۱۳۸۲؛ پایان نامه کارشناسی ارشد. بررسی تنوع ژنتیکی جنس یونجه براساس نشانگر SSR
- ۳ - میرزایی ندوشن، حسین، ۱۳۸۰؛ یونجه‌های یکساله (ژنتیک و اصلاح). انتشارات

13-Fitch, W. M., 1971; Towards defining the course of evolution. Minimum change for a specific tree topology. Systematic zoology 20: 406-416.

14-Heyn, C. C. 1984; Medicago in. K. H. Rechinger (ed.), Flora Iranica 157: 253-271. Akademische Druch. U. verlagsanstalt, Graz.

15-Lesins, K. A., and Lesins, I. 1979; Geaus medicago (Leguminosae). A taxogenetic study. Dr. W. Junk, Publishers, The Hayue.

16-Rose, R. J., Schlarbaum, S. E., Small, E., and Johnson, L. B. .1988; Chloroplast genomic variation and phylogeny in medicago section Intertextae. Can. J. Bot. 66: 1352-58.

17- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, 1989; Molecular cloning. A laboratory manual, 2nd , Cold Spring Harbor laboratory press.

18-Small, E. .1981; A numerical analysis of major grouping in medicago employing traditionally used characteres. Can. J. Bot. 59: 1553-77.

19-Small, E., and Jomphe, M. 1988; Asynopsis of the genus medicago (Leguminosae). Can. J. Bot. 67: 3260-3294.

20-Swofford, D. L. 1993; PAUP. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

21-Vitale, M., F. Pupilli, P. Labombarda, and S. Aricioni, .1998; RAPD analysis reveals a low rate of outcrossing in burr medic (*Medicago polymorpha* L.). Genetic Resources and Crop Evolution, 45: 337-342.

22-Yu, K., and Pauls, K. P. .1993; Rapid estimation of genetic relatendness among heterogeneous populations of alfalfa by random amplification of bulked genomic DNA samples. Theor Appl. Genet. 86: 788-794.

جدول ۲- توالی آغازگرهای مورد استفاده در آزمایش RAPD-PCR

توالی ۳' ۵'	شماره آغازگر
CCTGGGTCCA	۱۲
CCTGGGCCTC	۱۷
TGCCCCGAGC	۵۶
CGCACCGCAC	۱۵۲
CCACCCAGAG	۲۲۹
CGCCCCAGT	۲۶۲
CGGCCACCGT	۲۸۳
GGGCGCCTAG	۲۸۵
CGGAGCCGGC	۲۸۶
CGAACGGCGG	۲۸۷
CCGCGAGCAC	۲۹۰

7-Brummer, E. C., Kochert, C., and Bouton, J. H. 1991; RELP variation in diploid and tetraploid alfalfa. Theor. Appl. Gen. 83: 89-96.

8-Brummer, E. C., Bouton, J. H., and Kochert, G. .1995; Analysis of annual medicago species using RAPD markers. Genome 38: 362-367.

9-Dellaporta. SL, Wood J, and Hicks JB. 1983; A plant DNA minipreparation. version II. Plant Molecular Biology Report 1: 19-21

10-Echt, C. S., Erdahl, L. A., and McCoy, T. J. 1992; Genetic segregation of random amplified polymorphic DNA in diploid cultivated alfalfa. Genome, 35: 84-87.

11-Farris, J. S. .1989; The retention index and the rescaled consistency index. Cladistics 5: 417-419.

12-Felsenstein, J. .1985; Confidence limits on phylogenies: on approach using the bootstrap. Evaluation 39: 783-791.

