Archive of SID

ژنتیک نوین
دوره سوم ، شماره۳ ، پاییز ۱۳۸۷
صفحه۴۳-۳۵

بررسی تنوع ژنتیکی ارقام و توده های یونجه‌های(*Medicago sativa* L.) تحت کشت در ایران با استفاده از نشانگرهای RAPD

علی‌اکبر شاه نجات بوشهری*[۲]، حیدر علی فتاحی[۱]، بهمن یزدی صمدی[۳]
۱- دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات دانشگده کشاورزی دانشگاه تهران
۲ و ۳ - به ترتیب دانشیار و استاد دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران
*نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی : ashah@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۸۷/۶/۶ - تاریخ پذیرش: ۸۸/۲/۵)

چکیده

در این تحقیق بررسی تنوع ژنتیکی ۲۸ رقم ایرانی و خارجی یونجه زراعی (*Medicago sativa* L.) با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD بررسی گردید. برای این منظور بالک DNAی ژنومی از برگ گیاهان استخراج و توسط ۱٤ پرایمر تصادفی RAPD تکثیر و مورد ارزیابی قرار گرفت. در مجموع ۲۰۰ باند شناسائی گردید که ۵۹ درصد آن چند شکلی داشت. بر مبنای آنالیز روابط ژنتیکی ارقام به روش تجزیه خوشه‌ای و براساس ماتریس ضرایب تشابه تطابق ساده، داده‌های مولکولی همپوشانی مطلوبی با مناطق جغرافیائی نشان نداد. میزان تشابه ژنتیکی از ۰/۸۱ (جمعیت های زنجان و میاندوآب) تا ۰/٤۳ (جمعیت های جلفا و بمی) متغیر بود. میانگین تشابه ژنتیکی۰/٦۱ بدست آمد. بر اساس نتایج بدست آمده مشخص شد که ارقام از دامنه تنوع ژنتیکی پائینی برخوردار بوده و گسترش پایه ژنتیکی ارقام نیازی جدی به شمار می‌رود. این امر را می توان به پدیده انتقال فیزیکی بین جمعیت‌ها و دگرگشن بودن جمعیت‌های یونجه زراعی نسبت داد که خود متاثر از فعالیت حشرات بوده که با انتقال دانه گرده در بین ارقام سبب اختلاط و همپوشانی ارقام و افزایش تشابه ژنتیکی می‌گردد.

واژه های کلیدی
یونجه ،
تشابه ژنتیکی ،
چندشکلی ،
RAPD ،

مقدمه

جنس *Medicago* دارای ٥٦ گونه می‌باشد که ۲۲ گونه آن چندساله آلوگام و ۳٤ گونه یک ساله آتوگام است. تعداد کروموزم‌های پایه گونه‌های مختلف یونجه x=۸ و در برخی گونه‌ها x=۷ می‌باشد. از جمله این آلوگام‌های چندساله می‌توان به*Medicago sativa* (2n=4x=32) اشاره کرد که یکی از گیاهان مهم گیاه علوفه‌ای دنیا می‌باشد. گونه‌های یونجه عموماً آلوگام بوده و بین ۷۲ تا ۸۷ درصد دگرگشن می‌باشند.

www.SID.ir

Archive of SID

این میزان بستگی به شرایط محیطی و ژنوتیپ گیاه و میزان فعالیت حشرات دارد. (کاناپ و توبر ۱۹۹۳، براون و بینگام ۱۹۹٤). بنابر نظر واویلف[1] دانشمند روسی، مبدأ یونجه مرکز خاورنزدیک، آسیای صغیر، قفقاز، ایران و مناطق کوهستانی ترکمنستان روسیه است (کریمی، ۱۳٦۹).

ابداع نشانگرهای ژنتیکی مولکولی، امکان بررسی‌های گسترده‌ای را فراهم آورده است. مزیت نشانگرهای مولکولی بر نشانگرهای کلاسیک در توان بهره‌گیری از پلی‌مورفیسم‌های طبیعی موجود در جوامع است. در اکثر جوامع طبیعی، چندشکلی‌های به نسبت بالایی وجود دارد که در اثر تغییرات کوچکی در توالی‌های DNA نظیر جهش‌های نقطه‌ای، جایگزینی‌های بازی، حذف و تبادل حادث شده‌اند و فنوتیپ مشخصی هم ندارند. فناوری‌های جدید با آشکارسازی این چندشکلی‌ها کارآمدی بالای خود را در شناخت تفاوت‌های فردی به اثبات رسانده است. فراوانی نشانگرهای مولکولی فوق‌العاده زیاد است و در سراسر ژنوم یافت می‌شوند. به علاوه عوامل نموی، اختصاصیت بافتی و محیطی در تشخیص این چندشکلی بی‌تاثیر است (شاه‌نجات بوشهری، ۱۳۸۵). به کارگیری نشانگرهای مولکولی در یونجه کاربرد گسترده‌ای داشته است ، در این راستا از مارکرهای مولکولی برای شناسایی و مقایسه آرایش ژنتیکی ارقام و جمعیت‌های یونجه (برومر و همکاران ۱۹۹۱، کیدول و همکاران ۱۹۹٤)، شناسایی ویژگی‌های منحصر به فرد ژرم پلاسم‌یونجه (پوپیلی وهمکاران ۱۹۹۵)، نقشه‌یابی مولکولی مکان های کنترل کننده صفات مهم بر روی ژنوم یونجه (کیس وهمکاران ۱۹۹۳، یو و پائولس ۱۹۹۳، اسلج و همکاران ۲۰۰۵)، شناسایی ژن‌های انتقال یافته به نتاج در تلاقی بین گونه‌های یونجه (مک کوی و اسمیت ۱۹۸٦، مک‌کوی و اشت۱۹۹۳)، بررسی تفرق ژنتیکی (اشت و همکاران ۱۹۹۱) به کار رفته است. برومر و همکاران (۱۹۹۵) به آنالیز یونجه‌های یکساله با نشانگر RAPD پرداختند. قراردی وهمکاران (۱۹۹۸) فاصله جوامع یونجه را با RAPD تخمین زدند. منگونی و همکاران (۱۹۹۹) به وسیله RAPD و SSR روابط جوامع تتراپلوئید یونجه را ارزیابی کردند. تنوع ژنتیکی با مارکرهای دیگر نیز مورد ارزیابی قرار گرفته است (فاجولوس و همکاران ۲۰۰۵، موسیال و همکاران ۲۰۰۲، سگوویا لرما و همکاران۲۰۰۳، فرشادفر و فرشادفر ۲۰۰۸). خاستگاه یونجه ایران است. با توجه به کمبود علوفه و نیاز به تهیه ارقام اصلاح شده در داخل کشور، هدف این تحقیق بر پایه بررسی تنوع ژنتیکی ارقام با استفاده از نشانگرهای **RAPD** قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: در این بررسی به منظور استخراج DNA جهت مطالعه تنوع ژنتیکی بین ارقام از ۲۸ رقم ایرانی وخارجی تحت کشت در ایران استفاده گردید. ارقام مورد بررسی عبارت بودند از: کرمان، ملکان‌تبریز، رهنان‌اصفهان، قره‌یونجه، خوانساری، فریدون‌شهر، شهرکردی، کریستاری (خارجی)، شهربابک، کدی (خارجی)،رهنان، رنجر، یزدی، بمی، اصفهان، جلفا، استرالیایی (خارجی)، رهنانی، نیک‌شهری، افغانی، زنجان، سیمرچنسکایا (خارجی)، پاکستانی (خارجی)، تربتی، دامغان، همدانی، میاندواب، ایرانشهر.

استخراج DNA: استخراج DNA بر مبنای روش سقای معروف (۱۹۸٤) با اندکی تغییر صورت گرفت. میزان ۰/۱ تا ۰/۱۵ گرم از ۱۰ برگ جوان توسط ازت مایع در یک هاون چینی کوبیده شد. سپس به همراه ۸۰۰ میکرو لیتر بافر استخراج کننده (تریس ۱۰۰ میلی‌مول با pH= 8، ۱۰ گرم CTAB، ۱۰ میلی لیتر Tris-HCl ۱ مولار با pH= ۸، ۲۰ میلی لیتر EDTA ۰/۰۵ مولار با pH=۸، ۱٤۰ میلی لیتر NaCl ۵ مولار، ۲۹۰ میلی لیتر H_2O) به یک تیوب ۱/۵ میلی لیتری منتقل گردید و در بن‌ماری ٤۵–۳۰ دقیقه در دمای ٦۵ درجه نگهداری شدند (در بن‌ماری هر۱۰ دقیقه یکبار تیوب‌ها به آرامی مخلوط شدند).در مرحله بعد به مقدار دو سوم مخلوط داخل تیوب از محلول کلروفرم- ایزوآمیل الکل (۱:۲٤) به هر تیوب اضافه و به آرامی به مدت ۱۰ دقیقه تا ظهور رنگ سبز تیره این مخلوط به هم زده شد. سپس تیوب‌ها با دور ۱۳۰۰۰و به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای اتاق سانتریفیوژ شدند، مایع رویی هر تیوب به تیوب جدید منتقل و ۸۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد به هر یک اضافه شد. تیوب ها چند بار به آرامی مخلوط و در دمای

2-N.I.Vavilov

Archive of SID

۲۰- درجه به مدت ۲۰ دقیقه نگهداری شدند. در مرحله بعدی تیوب‌ها با دور ۱۳۰۰۰ و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس مایع رویی دور ریخته شد و تیوب حاوی رسوب DNA خشک شد. در این مرحله پس از افزودن ۱۰۰ میکرو لیتر TE به تیوب‌ها، ۸۰۰ میکرولیتر مخلوط استات آمونیم ۲/۵ مولار الکل:۱۰۰٪ (به نسبتcc ۱/۵: cc ۳/۵) به هر تیوب اضافه گردید تیوب‌ها به آرامی هم زده شدند و دوباره در دمای ۲۰- درجه به مدت ۲۰ دقیقه نگهداری شدند. در این مرحله تیوب‌ها با دور ۱۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ٤ درجه سانتریفیوژ شدند. مایع رویی تیوب ها، دور ریخته شد و ٦۰۰ میکرولیتر الکل ۷۰٪ به هر تیوب اضافه شد و سپس چند بار به آرامی هم زده شدند.) تیوب ها با دور ۱۳۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند مایع رویی دور ریخته شد و سپس تیوب‌ها کاملا خشک شدند و در مرحله آخر به هر تیوب ۲۰۰ میکرو لیتر TE اضافه شد. کمیت و کیفیت DNA توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Shimadzu UV-VIS Recording Spectrophotometer تعیین گردید. برای اسیدهای نوکلئیکی که از منابع بیولوژیکی استخراج می‌شوند، محاسبهٔ نسبت ۲٦۰ به ۲۸۰ نانومتر برآوردی از میزان پروتئین را در اختیار قرار می‌دهد. در صورتی که DNA عاری از پروتئین باشد این نسبت، ۱/۸ خواهد شد. در صورت آلودگی نمونه با پروتئین یا فنل، نسبت مذکور به پائین‌تر از ۱/۸ کاهش پیدا می‌کند. وجود RNA در نمونه، نسبت مذکور را به بیش از ۱/۸ سوق می‌دهد. RNA خالص این نسبت را به ۲ نزدیک می‌کند (سیدمن، ۲۰۰۸)

واکنش RAPD-PCR: براساس روش ویلیامز و همکاران (۱۹۹۰) انجام گرفت. حجم نهایی واکنش PCR برای هر نمونه ۲۵ میکرولیتر بود آغازگرها از شرکت UBC (University of British Colombia) خریداری شده بودند. در این آزمایش از دستگاه ترموسایکلر (Perkin elmer DNA Thermal cycler 480) استفاده شد. چرخه‌های دمایی واکنش PCR به صورت زیر بودند: ۱- سیکل اول ۲ دقیقه و در دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد برای شروع واشرست‌سازی DNA انجام گرفت. ۲- سیکل دوم ۵ چرخه و شامل: ۱ دقیقه در دمای۹۲ درجه، ۱ دقیقه در دمای ۳۷ درجه، ۲ دقیقه در دمای ۷۲ درجه. ۳- سیکل سوم ۳۵ چرخه و شامل: ۱ دقیقه در دمای۹۲ درجه، ۱ دقیقه در دمای۳۵ درجه، ۲ دقیقه در دمای ۷۲ درجه.٤- سیکل چهارم شامل یک مرحله ۵دقیقه ای در دمای ۷۲ درجه برای تکمیل بسط DNA انجام گرفت. در واقع برای جلوگیری از تکثیر های تصادفی از برنامه Touchdown استفاده شد. در این روش، واکنش ابتدا با دمای اتصال بالاتر از Tm آغازگر شروع می‌شود و سپس در طی چرخه-های ابتدایی PCR دمای اتصال به تدریج تا پایین‌تر از Tm کاهش داده می‌شود. این روش باعث می‌شود که اتصال اختصاصی آغازگرها به توالی هدف قبل از هرگونه اتصال غیراختصاصی انجام گیرد. که ۵ چرخه اول از ۳۷ درجه سانتیگراد شروع و هر سیکل ۰/۵ درجه از دمای اتصال کاسته و در دمای ۳۵ درجه بعد از ۵ سیکل دما ثابت و ۳۵ سیکل بعدی شروع شد. پس از اتمام چرخه‌ها، نمونه‌ها از دستگاه خارج شده و تا قبل از الکتروفورز در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

الکتروفورز فرآورده‌های تکثیر شده: نمونه‌های حاصل از PCR بر روی ژل عمودی اکریلامید توسط دستگاه Bio-Rad الکتروفورز و غلظت نهایی ژل اکریلامید ۳/۵ درصد انتخاب گردید. ولتاژ الکتروفورز ۱٦۰ ولت در نظر گرفته شد. پس از پایان الکتروفورز ژل با نیترات نقره رنگ آمیزی و سپس از آن عکس‌برداری گردید.

تجزیه و تحلیل و امتیاز بندی باندهای حاصل از داده های مولکولی: امتیاز بندی باندها بصورت صفر(عدم وجود باند) و یک (وجود باند) صورت گرفت. پس از این مرحله ماتریس تشابه و تجزیه خوشه‌ای با استفاده از نرم افزار NTSYS (رولف، ۱۹۹۰) بدست آمد و دندروگرام بر اساس الگوی کامل[1] (رولف، ۱۹۹۰) و ضریب تشابه تطابق ساده (سوکال و میچنر ۱۹۵۸) رسم شد. برای تعیین رابطه بین دو دسته از داده‌ها از آزمون مانتل استفاده شد (۱۹٦۷). برای تعیین اینکه رابطه‌ای بین یک دسته از

[1] Complete

www.SID.ir

Archive of SID

داده‌ها با دسته دیگر وجود دارد یا خیر می‌توان از این آزمون استفاده کرد. برای تعیین همبستگی بین ماتریس کوفنتیک (ماتریسی که براساس دندروگرام به‌دست می‌آید) و ماتریس فاصله یا تشابه (براساس آن خوشه‌بندی صورت می‌گیرد)، همبستگی کوفنتیک محاسبه شد. این ضریب می‌تواند به عنوان معیاری برای اندازه‌گیری نیکویی برازش خوشه‌بندی مورد استفاده قرار گیرد.

نتایج و بحث

در این تحقیق با آزمایش ١٤ پرایمر انتخابی(جدول ١) درمجموع ٢٠٠ باند تکثیر شده قابل نمره‌دهی بودند. (شکل ١). باندهایی که ازوضوح خوبی برخوردار نبودند، حذف شدند. اندازه باندها از ٤٧٠٠ تا ٥٥٠ جفت باز متغیر بودند. تعداد کل باندهای تکثیر شده به ازای هر پرایمر از ١٧ باند (UBC ٦٤) تا ٤ باند(UBC ٨٢) متغیر بودند (شکل ٢، الف). میانگین کل باندها ١٤/٢ و تعداد باندهای پلی مورفیک ١١٨ بود، یعنی به طور متوسط هر آغاز گر ٨/٤٢ باند چند شکل تولید کرد (شکل ٢). برومر و همکاران(١٩٩٩) متوسط تعداد باند را در گونه های مختلف یونجه ٣/٢ را گزارش نمودند. فلاحتی و همکاران (١٣٨٤)، متوسط تعداد باند را در ارقام مختلف یونجه ٢/٢٦ باند در هر گیاه بدست آوردند.

نسبت باند های چند شکل ٥٩ درصد و باندهای چند شکل بیشتر در محدوده٣٨٠٠ جفت باز تا ١٢٠٠ جفت بازقرار داشتند. میزان درصد چندشکلی دربین آغازگرها از ٣٧ درصد برای UBCV٦ تا ٨٥ درصد درUBC٦٤ متغیر بود (شکل ٢، ب). میزان تشابه ژنتیکی با استفاده از ضرایب تطابق ساده انجام گرفت که در توده‌های زنجان و میاندوآب با ٠/٨١ میزان تشابه دارای بیشترین و جمعیت‌های جلفا و بمی با ٠/٤٣ دارای کمترین میزان تشابه ژنتیکی بودند. میانگین تشابه ژنتیکی٠/٦١ بود. نظر به اینکه خاستگاه اصلی یونجه ایران ذکر شده دامنه تنوع ژنتیکی پائین است و گسترش پایه ژنتیکی ارقام نیازی جدی به شمار می‌رود.

این نتایج با نتایج فلاحتی وهمکاران (١٣٨٤) مطابقت داشت. منگونی و همکاران نیز میزان تنوع ژنتیکی را با استفاده از مارکر RAPD بین ٠/٢٨٣ تا ٠/٤١٢ و با میانگین ٠/٢٩٦ بدست آوردند. سمیعی وهمکاران (١٣٨٣) در مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت‌های شبدر میزان ضریب تشابه با استفاده از تطابق ساده بین ٠/٣٦ تا ٠/٩٠ و با میانگین ٠/٦٧ بدست آوردند. در این بررسی از ضریب تطابق ساده برای رسم نمودار خوشه‌ای با ضریب کوفنتیکr=٠/٦٧٣ استفاده شد که توسط آزمون مانتل و در سطح یک در صد معنی‌دار بودند. سمیعی وهمکاران (١٣٨٤) با استفاده از ضریب جاکارد همبستگی کوفنتیکی را ٠/٨٢ بدست آوردند.

در دندورگرام به دست آمده (شکل ٣)، چهار کلاستر شناسایی گردید ، که در دسته اول ارقام کرمان، رهنان اصفهان، خوانساری، شهرکردی و یزدی ارقام شهر بابک دامغان، پاکستان، نیک‌شهری، زنجان و میاندوآب قرار گرفتند. در این کلاستر از ١١ رقم موجود در آن، ٥ رقم کرمان، یزدی، نیک‌شهری، شهر بابک و پاکستانی جایگاه مناسبی را در دندروگرام به خود گرفته‌اند، به طوری که متعلق به مناطق گرمسیر وسردسیر با متوسط ضریب تشابه ٠/٦٨٥ هستند. دسته دوم شامل ارقام رهنان، ملکان تبریز، قره‌یونجه،کریستاری و فریدون شهری، اصفهان، کدی، رنجر وبمی بودند. به جز رقم بمی گرمسیر بقیه ارقام سردسیر و جایگاه مطلوبی را در دندروگرام به خود اختصاص دادند. متوسط میزان تشابه ژنتیکی در این دسته ٠/٦٤٨ بود. دسته سوم عمدتا شامل ارقام نیمه سرد تا نیمه گرم بودند، که ارقام استرالیایی، افغانی، رهنانی، سیمر ،تربتی و ایران‌شهری از آن جمله‌اند (متوسط میزان تشابه ژنتیکی ٠/٦٠٤). ارقام در این دسته از نظر خصوصیت اقلیمی وضع مشخصی ندارند. در دسته چهارم، دو رقم جلفا و همدانی با میزان تشابه ٠/٦٠١ قرار دارند، این دو رقم از ارقام منطقه شمال غربی کشور بوده و از خصوصیات بارز آنها می‌توان به مقاومت بسیار بالا به سرمای زمستان اشاره نمود. در خصوص عدم تطابق ارقام با شرایط اقلیمی در کلاسترها، این نکته قابل ذکر است که این عدم تطابق امری مرسوم در یونجه‌های مختلف کشور می‌باشد. به طور مثال در آزمایش‌هایی که درکرج (یزدی صمدی ١٣٧١) و مشهد (کوچکی وهمکاران ١٣٥٧) انجام گرفت به ترتیب ارقام کرمان و بمی (هردو گرمسیر) بالاترین عملکرد را نشان دادند.

Archive of SID

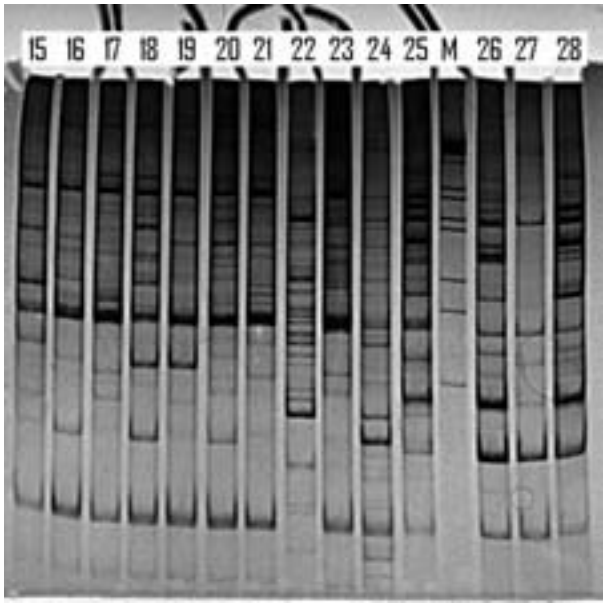
یکی از دلایل تشابه ژنتیکی بالا (تنوع ژنتیکی کم) احتمالا می‌تواند ناشی از ادغام وهمپوشانی زیاد جمعیت‌های زراعی باشد که در نتیجه جریان ژنی در بین جمعیت‌ها حاصل شده است. به نظر می‌رسد جمعیت‌های مختلف مورد کشت توسط زارعین، با گذشت زمان با هم اختلاط یافته ودر نتیجه جمعیت‌هایی متشکل ازژنوتیپ‌های مختلف بوجود آمده است. دلیل احتمالی دیگر اینکه جمعیت‌های زراعی یونجه دگرگشن بوده و میزان دگرگشنی بستگی به فعالیت حشرات گرده افشان دارد که این عامل نیز موقع گرده افشانی باعث انتقال گرده از یک جمعیت به جمعیت دیگر می‌گردد. مجموعه این عوامل سبب اختلاط و همپوشانی جمعیت‌ها و افزایش تشابه ژنتیکی گردیده است (فلاحتی و همکاران، ۱۳۸٤). قابل ذکر است که میانگین بالای تشابه ژنتیکی۰/٦۱ با توجه به اینکه ایران خاستگاه این گیاه می‌باشد چندان رضایت بخش نیست، و گسترش پایه ژنتیکی این محصول مهم نیازی جدی بشمار می‌آید. این نتایج با مطالعات فلاحتی وهمکاران(۱۳۸٤) منگونی و همکاران(۱۹۹۹) سمیعی وهمکاران (۱۳۸۳)مطابقت‌داشت.

جدول (۱) : لیست نام و توالی پرایمری آنها همراه با تعداد باندهای تکثیری برای هر آغازگر

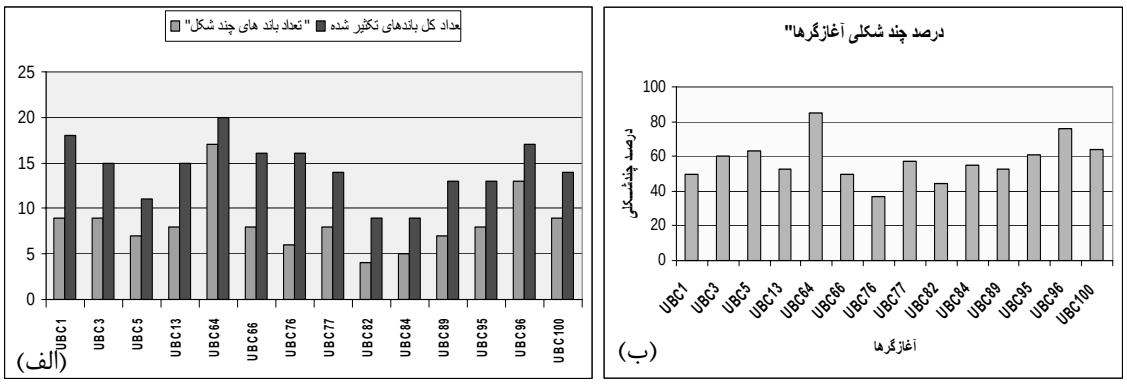
آغازگر	توالی ´۳ ⟵ ´۵	تعداد باندهای تکثیرشده	تعداد باندهای چند شکل	تعداد باندهای یک شکل	درصد چند شکلی
UBC1	٥'CCTGGGCTTC 3'	**18**	**9**	**9**	**50**
UBC3	5' CCTGGGCTTA 3'	**15**	**9**	**6**	**60**
UBC5	'5 CCTGGGTTCC 3	**11**	**7**	**4**	**63**
UBC13	5' CCT GGG TGG A 3'	**15**	**8**	**7**	**53**
UBC64	5' GAGGGCGGGA 3'	**20**	**17**	**3**	**85**
UBC66	5' GAGGGCGTGA 3'	**16**	**8**	**8**	**50**
UBC76	5' GAGCACCAGT 3'	**16**	**6**	**10**	**37**
UBC77	5' GAGCACCAGG 3'	**14**	**8**	**6**	**57**
UBC82	5' GGGCCCGAGG 3'	**9**	**4**	**5**	**44**
UBC84	5' GGG CGC GAG T 3'	**9**	**5**	**4**	**55**
UBC89	5' GGGGGGCTTGG 3'	**13**	**7**	**6**	**53**
UBC95	5' GGG GGG TTG G 3'	**13**	**8**	**5**	**61**
UBC96	5' GGC GGC ATG G 3'	**17**	**13**	**4**	**76**
UBC100	5' ATCGGGTCCG 3'	**14**	**9**	**6**	**64**
TOTAL		**200**	**118**	**82**	**59**

www.SID.ir

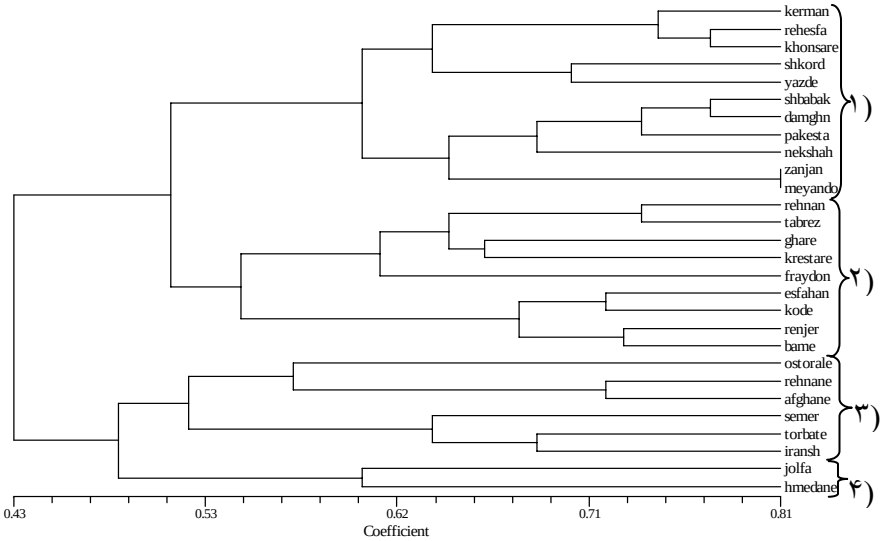
Archive of SID



شکل۱. تصویر مربوط به آغازگر UBC۸۹



شکل ۲- تعداد باند های تکثیر شده (الف) و درصد چند شکلی آغازگرها (ب) در ارقام مورد مطالعه



شکل ۳- دندروگرام حاصل از روش Complete و ضریب تشابه تطابق ساده

Archive of SID

به طور کلی به نژادی یونجه بعلت خودناسازگاری، مشکل بودن دورگ گیری و اثرات شدید سوء اینبریدینگ (خویش آمیزی) از مشکلاتی برخوردار است و نیاز به روش‌های اصلاحی خاصی دارد. توارث تترازومیک، پس‌روی اینبریدینگ شدید، تنوع ژنتیکی بالا و تجاری سازی ارقام ساختگی استفاده از مارکرهای مولکولی در برنامه‌های اصلاحی را با محدودیت مواجه می‌کند (برومر و همکاران ۱۹۹٤). بسیاری ازمطالعات حکایت از نتایج متناقض کاربرد تنوع ژنتیکی در انتخاب والدین هیبریدها و یا ارقام ساختگی دارد به طوری که تخمین دقیق عملکرد نتاج دربسیاری از حالات با مشکل مواجه بوده است. (گودشالک وهمکاران ۱۹۹۰، لی و همکاران ۱۹۸۹). بطور مثال در یک مطالعه با استفاده از مواد اصلاحی والدی هیچ رابطه واضحی دربین جوامع حاصل از اعضای متفاوتی که بر اساس تشابه RFLP انتخاب شده بود مشاهده نگردید (کیدول وهمکاران ۱۹۹۹). همچنین اسلج وهمکاران(۱۹۹۸) با استفاده از یک ژرم پلاسم فاقد خواب[1] بنام CUF_{101} و با استفاده از نشانگرهای AFLP و میزان دوری ژنتیکی، از یک جامعه ۱۲۰ عضوی ۱۲ و ۲٤ والد را انتخاب کردند. این محققین عملکرد واریته‌های ساختگی حاصل از ۱۲، ۲٤ و ۱۲۰ ژنوتیپ ها را مقایسه کردند و هیچ تغییری در واکنش های دفاعی این جوامع با محدود کردن ۱۲۰ به ۱۲ عضو مشاهده نکردند.

دلیل عمده این امر آن است که استفاده از مارکرهای تصادفی در بعضی از آنالیزها مشکلاتی به همراه دارد و خطاهای بسیار زیادی را در آنالیزها وارد می‌کند، به این دلیل که بسیاری ازژن‌های مورد علاقه به مارکرها پیوسته نمی‌باشند و یا اینکه پایه ژنتیکی مواد آزمایشی محدود می‌باشد. بااین وجود مارکرها ممکن است به عنوان ابزاری جهت شناسایی والدین برتر برای تهیه جوامع یا ارقام مفید واقع گردد. در این راستا و با کشف وجود رابطه بین فاصله ژنتیکی و عملکرد علوفه در یونجه تتراپلوئید توسط کیدول و همکاران (۱۹۹٤) این امید پیدا شد که مارکرها می‌توانند در انتخاب والدین در یک برنامه اصلاحی یونجه مفید واقع شوند. نتیجه اینکه تشابه یا دوری ژنتیکی گروهی از والدین بالقوه می‌تواند از داده های مارکری تعیین و متنوع‌ترین ژنوتیپ‌ها به عنوان والدین ارقام ساختگی انتخاب گردند. با استفاده از مارکرهای پیوسته به ژن‌های کنترل کننده صفات مورد علاقه (مانند عملکرد) در انتخاب والدین از یک پایه ژنتیکی وسیع ممکن است که یک استراتژی روشن‌تری برای موفقیت در شناسایی والدین برتر بدست آید. از طرفی برای شناسایی گروه‌های هتروتیک بالقوه بر مبنای تنوع در نشانگرها طرحی پیشنهاد شده است (برومر ۱۹۹۹) که در آن انتخاب درداخل دو گروه به صورت مستقل انجام می‌شود. گیاهان برتر از هر گروه در ایزولاسیون تکثیر و برای تولید بذر پایه مورد استفاده واقع می‌شوند. در مرحله بعد در مزرعه این دو با هم مخلوط شده و بذر هیبرید تولید می شود. این روش اثر بزرگتری نسبت به حالت قبل در پیشرفت عملکرد می‌تواند داشته باشد، لازم به ذکر است که تفکیک در بین گروه‌های هتروتیک امری ضروری است. بدون شک در ادامه راه، مارکرهای مولکولی درک واضح‌تری از ژنوم مدیکاگو را در اختیار قرار خواهند داد. مطالعه مارکرهای مولکولی در یونجه نیاز به تمرکز بر چند عامل دارد: ۱) ساختار جامعه، ۲) میزان واکنش به انتخاب، ۳) اثرمتقابل ژنوتیپ- محیط و ٤) انتخاب به کمک مارکر برای آلل‌های چندگانه. در مطالعه حاضر ساختار جامعه مورد توجه بوده و عوامل دیگر نیاز به استفاده از نشانگرهای دیگر و همچنین بررسی‌های فنوتیپی در محیط‌ها و سال‌های مختلف دارد. تجریه وتحلیل نشانگرها همراه با داده‌های فنوتیپی می‌تواند منجر پیشرفت اساسی در روش‌های انتخاب و استراتژی اصلاحی گردد.

یکی از معمول‌ترین روش‌های تهیه ارقام یونجه تولید واریته‌های سینتیک یا ساختگی می‌باشد که مبتنی بر ژنوتیپ‌های با قدرت ترکیب‌پذیری عمومی بالا می‌باشد. با توجه به نتایج به دست آمده از این آزمایش ارقام ایرانی جلفا، تربتی، فریدونشهری، همدانی، و ایرانشهری، بالاترین فاصله ژنتیکی را با بقیه نشان دادند که با توجه به مطالعات تکمیلی می‌توان از این ارقام به عنوان والدین ارقام سنتتیک استفاده نمود. قابل ذکر است که بوشهری و سپاهی (۱۳٦۷) در یک برنامه سه ساله که به منظورقدرت ترکیب‌پذیری ارقام یونجه از نظر عملکرد و سایر خصوصیات مهم زراعی بر

[1] Nondormant

www.SID.ir

Archive of SID

روی بذور حاصل از پلی‌کراس ۱۵ رقم یونجه انجام دادند و ٦ رقم ایرانی به عنوان کاندیدای تولید رقم سینتتیک را معرفی نمودند که در بین آنها دو رقم برتر این آزمایش یعنی ارقام ایرانشهری و همدانی نیز قرار داشتند. این دو از جمله ارقامی هستند که کمترین میزان میانگین تشابه ژنتیکی را با دیگر ارقام مورد آزمایش در بررسی حاضر نیز دارا بودند.

منابع

۱. سمیعی ، ک . (۱۳۸۳) بررسی تنوع ژنتیکی در شبدر بااستفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی و مولکولی . پایان نامه کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان .

۲. شاه‌نجات بوشهری، ع.(۱۳۸۵). بیوتکنولوژی مولکولی و تولید مواد غذایی گیاهی. انتشارات نقش مهر. ۸۲۵ ص.

۳. شاه نجات بوشهری ، ع. و ع. سپاهی. (۱۳۷۰) ارزیابی قدرت ترکیب پذیری عمومی ۱۵ رقم یونجه زراعی. مجله علوم کشاورزی ایران. جلد ۱۵، شماره ۱ و ۲، ص ۸۸-۷۰.

٤. فلاحتی، ع.، حبشی، ع.، اصفهانی، م. محمدی، س. و ب. قره یاضی. (۱۳۸٤). ارزیابی ساختار وتنوع درون وبین جمعیتی یونجه های زراعی(*Medicago sativa* L.) ایران با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره. مجله علوم کشاورزی ایران. جلد ۳٦،شماره ٤ : ۹۸۹-۹۷۹

۵. کریمی (۱۳٦۹). یونجه . انتشارات دانشگاه تهران . چاپ اول . ص ۲۱-۷

٦. کوچکی، ع. و ع. ریاضی، (۱۳۵۷). مقایسه ٦ رقم یونجه از لحاظ خصوصیات مورفولوژیکی و میزان عملکرد. مجله علوم کشاورزی ایران، جلد دوم شماره های (۲ و ۳) : ۲۵-۲۹ .

۷. یزدی صمدی، ب. (۱۳۷۱). بررسی ارقام یونجه از لحاظ صفات مهم زراعی در کرج. مجله علوم کشاورزی ایران ۲۵ (۲) : ۳۱-۱۹

8. Brown, D.E. and Bingham ET,(1994). Selfing in an alfalfa seed production field. Crop Sci 34: 1110-1112

9. Brummer, E. C. (1999). Capturing hetrosis in forage crop cultivar development. Crop Sci. 939-943.

10. Brummer, E. C., G. Kochert and J. H. Botoun .(1991). RFLP variation in diploid and tetraploid alfalfa (*Medicago sativa L.*).Theor.Appl.Genet. 83:89-96.

11. Brummer, E. C., J. H. Botoun and G. Kochert. (1995). Analysis of annual *Medicago* species using RAPD markers. Genome. 38: 362-367.

12. Brummer, E. C., Sledge, M. K., Bouton J. H., and G. Kochert.(1994). Molecular marker analysis in alfalfa and related species. pp: 169-180. In: Phillips, R. L., and I. K. (eds), DNA-bsed markers in plants. Kluwer academic publishers-Dordrecht/Boston/London.

13. Echt CS, Kidwell KK, Knapp SJ, Osborn TC, McCoy TJ (1994) Linkage mapping in diploid alfalfa (*Medicago sativa*). Genome37:61–71.

14. Fajoulot, S., Ronfort, J., Baudoin, P., Barre P., Haguet, C. and Julier B. (2005). Genetic diversity among alfalfa (*Medicago sativa*) cultivars coming from a breeding program, using SSR markers. Theor. Appl. Genet. 111(7): 1420-1429.

15. Farshadfar, M., Farshadfar, E. (2008). Genetic variability among lucerne cultivars based on biochemical (SDS-PAGE) and morphological markers. Journal of applied sciences. 8(10): 1867-1874.

16. Ghérardi, M., Mangin, B., Goffinet, B., Bonnet, D., and Huguet, T. (1998). A method to measure genetic distance between allogamous populations of alfalfa (*Medicago sativa*) using RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 96: 406–412.

17. Godshalk, E.B., Lee, M., and Lamkey, K.R.(1990) Relationship of restriction fragment length polymorphism to single-cross hybrid performance in maize. Theor Appl Genet. 80:273-280.

18. Kidwell KK, Bingham ET, Woodfield DR, Osborn TC (1994b) Relationships among genetic distance, forage yield, and heterozygosity in isogenic diploid and tetraploid alfalfa populations. Theor Appl Genet 89:323–328.

19. Kidwell, K.K., Austin, D.F., and Osborn T.C. (1994b). RFLP evaluation of nine *Medicago* accessions representing the original germplasm sources for North American alfalfa cultivars. Crop Sci. 34: 230–236.

20. Kiss GB, Csanádi G, Kálmán K, Kaló P, Ökrész L (1993) Construction of a basic genetic map for alfalfa using RFLP, RAPD, isozyme, and morphological markers. Mol Gen Genet 238:129–137.

Archive of SID

21. Knapp, E. E. and Teuber, L. R. (1993) Outcrossing rate of alfalfa population differing in ease of floret tripping. Crop Sci 33: 1181-1185.

22. Lee, M., Godshalk, E.B., Lamkey, K.R. and Woodman, W.W. (1989). Association of restriction fragment length polymorphisms among maize inbreds with agronomic performance of their crosses. Crop Sci29: 1067-1071.

23. Mantel, N. 1967. The detection of diseae clustering and a generalized regression approach. Cancer Res. 27:209-220.

24 McCoy T, J. and Echt C, S.(1993) Potential of trispecies bridge crosses and random amplified DNA makers for introgression of *Medicago dzhawakhetica* and *M. pironae* germplasm into alfalfa(*M. sativa*). Genome 36: 594-601.

25. McCoy T, J. and Smith, L. Y. (1986) Interspecific hybridization of perennial *Medicago* species using ovule-embryo culture .Theor. Appl. Genet 71: 772-783

26. Mengoni.A. , A. Gori and M. Bazzicalupo.(1999). Use of RAPD and microsatellite (SSR) variation to assess genetic relationships among populations of tetraploid alfalfa, *Medicago sativa*. Plant Breeding.119: 311-317.

27. Musial, J. M., K. E. Basford and J. A. G. Irwin. (2002). Analysis of genetic diversity within Australian Lucern*e* cultivars and implications for future genetic improvement. Aust. J. Agri. Res. 53: 629-636.

28. Pupili, F., Businelli, S., Cacenes , M.E., Damiani. F, and Arcioni, S. (1995) Molecular cytological and morpho-agronomical characterization of hexaploid somatic hybrids of *Medicago*. Theor. Appl. Genet 90: 347-355.

29. Rohlf, F. J. (1990). NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Ver. 2.02. Exeter sotware, Setauket, New York.

30. Saghai-Maroof MA, Soliman KM, Jorgensen RA, Allard RW. (1984) Ribosomal spacer length polymorphism in barley: mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. Proc Natl Acad Sci USA 83: 1757–1761.

31. Segovia – Lerma .A , R.G. Cantrell , J.M. Conway , and I.M. Ray . (2003). AFLP – based assessment of genetic diversity amony nine alfalfa garmplasms Using bulk DNA templates . Genome . 46: 51- 58.

32. Seidman, L. A. (2008). Basic laboratory calculations for biotechnology. Pearson Pub. P. 482.

33. Sledge, M.K., Bouton, J.H, and Kochert, G.(1998) Molecular Marker Diversity as a Means of Selecting Parents for Synthetic Cultivars. Proc. North Amer. Alfalfa Impr. Conf. :73-74 Bozeman, MT. 1-6 Aug.

34. Sokal, R. R., and C. D. Michner. 1958. A statistical method for evaluating systematic relationships. Univ, Kons. Sci. Bull., 38: 1409-1438.

35. Sledge, MK., Ray, IM., and Jiang G. 2005. An expressed sequence tag SSR map of tetraploid alfalfa Medicago sativa L.). Theor. Appl. Genet. 111: 980- 992.

36. Williams ,J.G. k., A. R. Kubelik , K.J. Livak , J. A. Rafalski & S.V. Tingey (1990) DNA polmorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research 18: 6531- 6530.

37. Williams,J.G.K.,M.K.Hanafey.,J.A.Rafalaski and S.V.Tingey.(1993) Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. Methods Enzymol.218:704-740.

38. Yu, K., and K.P. Pauls. (1993). Rapid estimation of genetic relatedness among heterogeneous populations of alfalfa by random amplification of genomic DNA samples. Theor. Appl. Genet. 86:788–794.

www.SID.ir