

بررسی تنوع ژنتیکی ۱۷ جمعیت از یونجه (*Medicago sativa*) با استفاده از صفات کاربوتیپی و نشانگر مولکولی ISSR

محسن فرشادفر^{۱*}، مریم رشیدی^۲، هوشمند صفری^۳ و هومن شیروانی^۴

*۱- نویسنده مسئول مکاتبات، دانشیار، گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور

پست الکترونیک: farshadfarmohsen@yahoo.com

۲- کارشناس ارشد، اصلاح نباتات دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمانشاه، کرمانشاه

۳- مربی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه، کرمانشاه

۴- کارشناس ارشد گروه کشاورزی دانشگاه پیام نور

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۹/۲۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۶/۲۳

چکیده

یونجه در بین گیاهان علوفه‌ای، به علت کیفیت خوب و داشتن ذخایر غذایی و سازگاری و تنوع وسیع جایگاه ویژه‌ای دارد. تنوع ژنتیکی ۱۷ جمعیت از یونجه با استفاده از صفات کاربوتیپی و ۸ آغازگر ISSR بررسی شد. آغازگرهای ISSR در مجموع توانستند ۴۴ باند تولید کنند. آغازگرهای IS₃، IS₁₄ و IS₁₁ بیشترین تعداد باند و آغازگر IS₁₆ کمترین تعداد باند را نشان دادند. میانگین درصد چند شکلی در آغازگرهای مورد استفاده برابر ۹۰/۱۸٪ محاسبه شد. میانگین محتوی اطلاعات چند شکلی (PIC) و شاخص نشانگر (MI) در آغازگرهای مورد بررسی به ترتیب برابر ۰/۳۶ و ۱/۸۸ بود که بیشترین میزان مربوط به سه آغازگر متفاوت بود و یکی از آغازگرها کمترین میزان را داشت. دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای بر اساس ضریب تشابه دایس نشان داد که می‌توان جمعیت‌ها را در ۴ گروه قرار داد. مطالعات کاربوتیپی نشان داد تمام جمعیت‌های مورد بررسی تتراپلوئید بوده و تعداد کروموزوم پایه در تمامی جمعیت‌های مورد مطالعه ۸ بود. فرمول کاربوتیپی برای تمام جمعیت‌ها 16m بود، بنابراین می‌توان بیان داشت که کاربوتیپ تمام جمعیت‌ها از کروموزوم متاسانتریک تشکیل شده است. نتایج تجزیه واریانس تنوع معنی‌داری را در بین جمعیت‌ها برای تمامی صفات کاربوتیپی نشان داد. جمعیت‌ها برای صفات مورد بررسی در دسته‌های متفاوتی قرار گرفتند. جمعیت‌های مورد بررسی با استفاده از تجزیه خوشه‌ای گروه‌بندی شدند و در ۴ گروه قرار گرفتند.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، سیتوژنتیک، نشانگر مولکولی ISSR، یونجه.

مقدمه

مثبتی بر محیط خاک نیز می‌گذارد (Tucak et al., 2008). در بین گیاهان علوفه‌ای، به علت کیفیت خوب و داشتن ذخایر غذایی، از جمله مواد معدنی مختلف مانند کلسیم، مواد پروتئینی و ویتامین‌های گوناگون به خصوص ویتامین‌های A و C،

یونجه (*Medicago sativa* L.) از مهم‌ترین گیاهان علوفه‌ای بومی ایران است که در شرایط متنوع آب و هوایی می‌روید. یونجه علاوه بر این که علوفه‌ای با کیفیت بالا تولید می‌کند اثر

مولکولی نیمه تصادفی هستند که نسبت به نشانگر RAPD کارآمدتر می‌باشند (Sicard *et al.*, 2005). این تکنیک به طراحی آغازگر نیاز ندارد و میزان چندشکلی بیشتر و آشکارسازی راحت‌تری نسبت به دیگر نشانگرهای مولکولی دارد (Terzopoulos & Bebeli, 2008). این نشانگرها در مطالعات تنوع ژنتیکی، فیلوژنی، نشان‌دار کردن ژنی، نقشه‌یابی ژنومی و زیست‌شناسی تکاملی به‌کار می‌روند (Reddy *et al.*, 2002). وجود اختلاف ژنتیکی گسترده در بین جمعیت‌های یونجه که به دلیل دگرگشتی و تترابلوئید بودن آن اتفاق می‌افتد مطالعات مربوط به ژنتیک جمعیت این محصول را پیچیده کرده است و به همین سبب پیدا کردن اطلاعات لازم در مورد ژرم پلاسم ارقام مختلف مخصوصاً زمانی که از منابع مختلف جمع شده باشند اهمیت اساسی دارد (Mengoni *et al.*, 2000). لذا تحقیق حاضر با هدف بررسی تنوع ژنتیکی در سطح مولکولی و صفات کاربوتیبی در جمعیت‌های مختلف یونجه انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

در تحقیق انجام شده ۱۷ جمعیت یونجه تهیه شده از بانک ژن منابع طبیعی ایران (جدول ۱) در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه پیام نور مرکز کرمانشاه مورد ارزیابی قرار گرفت.

اهمیت خاصی پیدا کرده است (Rezaei, 2001). بررسی تنوع ژنتیکی موجود بین جمعیت‌های گیاهی یکی از موضوعات مورد علاقه دانشمندان می‌باشد. در روش‌های متداول اصلاحی، جمعیت‌های مطلوب از داخل یک توده دارای تنوع ژنتیکی انتخاب می‌گردند و با ایجاد تغییراتی در بعضی از صفات مهم آنها، یک وارپته تجاری تولید می‌شود (Vern & Donald, 2006). مطالعه تنوع ژنتیکی بر اساس نشانگرهای ریخت-شناسی، شیمیایی، بیوشیمیایی، مولکولی و سیتوژنتیکی انجام می‌گیرد (Michaud *et al.*, 1991; Gupta, 1995). غالباً از تنوع ژنتیکی به‌عنوان معیاری برای انتخاب والدین استفاده می‌شود (Farshadfar *et al.*, 1995). سیتوژنتیک یک علم بین رشته‌ای است که شامل عناوین و روش‌های ژنتیک و سیتولوژی می‌باشد و مطالعه رفتار ماده ژنتیکی در تقسیم‌های میتوزی و میوزی و نحوه انتقال آن در سطح سلول از عمده مباحث سیتوژنتیک است (Majd & Sharyat Zade, 2001). وضعیت کروموزومی کاربرد وسیعی در طبقه‌بندی گیاهان و کمک به حل مسائل و مشکلات آن دارد. کروموزم‌ها تنها عوامل مناسبی می‌باشند که به کمک آن‌ها می‌توان به نحوه تکامل موجودات زنده پی‌برد (Mirzaie Nodoushan *et al.*, 2002). امروزه برای بررسی تنوع ژنتیکی از نشانگرهای مولکولی به‌طور گسترده استفاده می‌شود (Ronald & Indra, 2001). توالی‌های بین ریز ماهواره (ISSR) نشانگرهای

جدول ۱- فهرست جمعیت‌های مورد بررسی

شماره	منشأ	کد بانک ژن	شماره	منشأ	کد بانک ژن
۱	سیرجان	Es-026	۱۰	ورامین	Es-030
۲	قزاقی ۱	KR-2197	۱۱	سبزوار	Es-025
۳	جیرفت	Es-035	۱۲	ایتالیا ۲	Es-075
۴	دامغان	Es-023	۱۳	خارجی	Es-012
۵	کرمانشاه	Es-049	۱۴	کبریت	Es-088
۶	ایتالیا ۱	Es-074	۱۵	فرانسه	KR-3002
۷	خانسار	Es-046	۱۶	ناشناخته	G16
۸	گرگان	Es-009	۱۷	ناشناخته	G17
۹	همند	Es-040			

بررسی‌های مولکولی

به منظور استخراج DNA، ابتدا بذور در گلدان کشت و از هر جمعیت ۵ بوته برای نمونه‌گیری انتخاب شد. استخراج DNA به روش Torres و همکاران، (۱۹۹۳) و به صورت بالک برای جمعیت‌ها انجام گرفت. کیفیت و درصد و روش اسپکتروفتومتری مشخص شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) در حجم ۲۰ میکرولیتر (۵۰ نانوگرم DNA الگو، ۲ میلی‌مولار MgCl₂، ۰/۰۵ میلی‌مولار از هر dNTP، ۰/۲ میکرومول آغازگر، یک واحد آنزیم Taq DNA Polymerase و بافر واکنش به مقدار ۱x) انجام شد. چرخه حرارتی شامل یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۵ دقیقه و ۳۵ چرخه حرارتی بود که در هر چرخه نیز، زمان و دمای واسرشت‌سازی به ترتیب ۳۰ ثانیه و ۹۵ درجه سانتی‌گراد، زمان اتصال آغازگر ۳۰ ثانیه و دمای آن برای هر آغازگر متفاوت بود. همچنین زمان و دمای توسعه رشته نیز به ترتیب ۶۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. توسعه نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. در این آزمایش از ژل آگارز ۲ درصد با بافر واکنش TBE یک درصد استفاده شد. بدین ترتیب که ابتدا میزان ۵ میکرولیتر بافر نمونه‌گذاری به DNAهای تکثیر شده اضافه و سپس میزان ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه به درون چاهک‌های ایجاد شده در ژل آگارز تزریق و با ولتاژ ۱۰۰ و مدت ۲/۵ ساعت حرکت صورت گرفت و سپس ژل را جهت رنگ‌آمیزی در محلول اتیدیوم برمایید (یک میکروگرم در میکرولیتر) به مدت ۳۰-۴۵ دقیقه قرار داده و از دستگاه Gel Document جهت نمایان شده باندها استفاده شد. در پایان نیز با استفاده از نرم‌افزارهای Darwin 6 و GenAIEx 6.2 داده‌های حاصل بررسی شدند. محتوی اطلاعات چند شکلی Polymorphic Information PIC،

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n PI^2$$
 (Content) از طریق فرمول (Hou et al., 2005) و شاخص نشانگری (MI, Marker Index) برای هر آغازگر از رابطه $MI = PIC \times E$ (Powell et al., 1996) محاسبه شد.

بررسی‌های سیتوژنتیکی

در ابتدا بذور کشت شدند و تحت شرایط کنترل شده، در ژرمیناتور قرار گرفتند. پس از رشد، ریشه‌های با طول ۱-۰/۵ سانتی‌متر برای نمونه‌گیری انتخاب شدند. با توجه به شرایط کنترل شده فوق، مریستم ریشه‌های یونجه، در فواصل زمانی ۱۰-۹ صبح دارای بیشترین تعداد سلول‌های متافازی بودند. به منظور عمل پیش‌تیمار، ریشه‌ها در محلول آلفا بروموناتالین ۰/۵ درصد به مدت ۳ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از این مرحله ریشه‌ها برای عمل تثبیت مدت ۱۸ ساعت در محلول لویتسکی قرار گرفتند. بعد از تثبیت نمونه‌ها به مدت ۳ ساعت در آب جاری شستشو شدند. مهمترین مرحله در بررسی‌های سیتوژنتیکی، اسکواش (Squash) در حد مطلوب است تا اولاً سلول‌ها به طور کامل از یکدیگر جدا شوند و در یک سطح قرار گیرند و ثانیاً عمل رنگ‌آمیزی به بهترین نحو ممکن صورت پذیرد. به این منظور پس از خارج کردن ریشه‌ها از محلول الکل اتیلیک ۷۰ درصد و شستشوی آنها با آب، نمونه‌ها در ماده هیدرولیزکننده (NaOH ۱ نرمال) در درجه حرارت ۶۲ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۸ دقیقه قرار داده شدند. بعد از هیدرولیز، نمونه‌ها در محلول رنگ هماتوکسیلین به مدت ۳ ساعت قرار گرفتند. پس از قراردادن نمونه‌ها روی لام، قسمت مریستمی با استفاده از تیغ مخصوص برش داده شد و یک قطره محلول اسید استیک ۴۵ درصد روی نمونه ریخته و لامل روی آن گذاشته شد، با وارد کردن ضربات آهسته بر روی نمونه سلول‌های ریشه پخش شدند. به منظور عکس‌برداری از سلول‌های متافازی

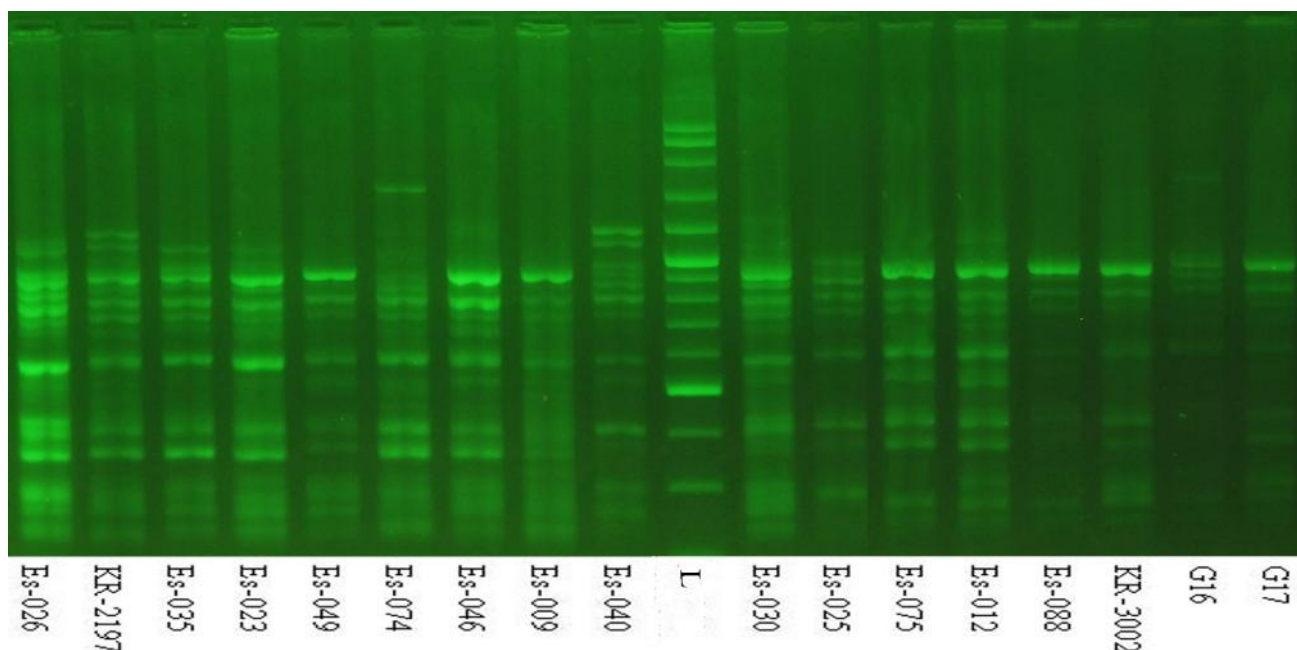
آماري توسط نرم افزار MSTATC و MINITAB صورت گرفت.

نتایج

تنوع مولکولی

تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مورد مطالعه با استفاده از ۱۲ آغازگر ISSR بررسی شد که از این ۱۲ آغازگر تنها ۸ عدد دارای باندهای قابل امتیازدهی بودند. آغازگرهای ISSR در مجموع توانستند ۴۴ باند تولید کنند که از این تعداد تنها ۴ باند یک شکل مشاهده شد و سایر باندها چندشکل بودند. آغازگر-های IS_3 ، IS_{14} و IS_{11} بیشترین تعداد باند (تعداد ۷ باند) و آغازگر IS_{16} کمترین تعداد باند (تعداد ۳ باند) را نشان دادند. شکل ۱ الگوی باندهای ۱۷ جمعیت مورد بررسی با استفاده از آغازگر IS_3 را نشان می‌دهند.

ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از سیستم مانیتورینگ استفاده شد. تصاویر کروموزومی از طریق دوربین نصب شده بر روی میکروسکوپ نوری ذخیره شدند. کروموزوم‌های ۵ سلول متافازی عکس‌برداری شده از هر ژنوتیپ در نرم‌افزار Photoshop برش زده و در یک فایل جداگانه، مرتب شدند. با استفاده از نرم افزار MicroMeasure و از طریق مشخص کردن ابتدا و انتهای کروموزوم و محل سانترومر آنها، یکسری از ویژگی‌های کروموزومی نظیر طول کل کروموزوم (TL)، طول بازوی بلند (LA)، طول بازوی کوتاه (SA)، نسبت بازوها (AR)، شاخص سانترومری (CI) محاسبه و در محیط Excel ذخیره شدند. لازم به ذکر است که بزرگنمایی تصاویر حاصل از لنز X100 و با استفاده از دوربین موجود در سیستم مانیتورینگ تقریباً ۲۷۷۵ برابر بود. در پایان تجزیه‌های



شکل ۱- الگوی باندهای ۱۷ جمعیت یونجه با استفاده از آغازگر IS_3

IS_{14} (۷۱/۴۲٪) و IS_5 (۸۳/۳۳٪) داشتند و درصد چندشکلی برای سایر آغازگرها ۱۰۰٪ بود. متوسط تعداد باندهای تولید شده توسط هر آغازگر برای ۱۷ جمعیت برابر ۵/۵ بود جمعیت Es-026 بیشترین و جمعیت Es-

نتایج به دست آمده برای آغازگرهای استفاده شده در جدول ۲ ارائه شده است. میانگین درصد چندشکلی در آغازگرهای مورد استفاده برابر ۹۰/۱۸٪ بود، کمترین میزان درصد چندشکلی را آغازگرهای IS_{16} (۶۶/۶۶٪)،

ماتریس تشابه

تشابه ژنتیکی جمعیت‌های مورد بررسی با استفاده از ضریب تشابه دایس از ۰/۴۸۰ تا ۰/۸۰۰ متغیر بود (جدول ۳)، میانگین تشابه بین جمعیت‌ها برابر ۰/۶۵۸ بود. بنابراین می‌توان بیان داشت تنوع نسبتاً مطلوبی در بین جمعیت‌های مورد بررسی بر اساس نشانگر ISSR وجود داشت. بیشترین تشابه را جمعیت‌های Es-074 با Es-025، Es-026 با Es-049، Es-049 با KR-3002 و Es-074 با Es-046 داشتند و کمترین تشابه مربوط به جمعیت‌های KR-2197 با Es-040، Es-023 با Es-025، Es-040 با Es-012 و Es-088 با G-16 بود.

049 کمترین تعداد باند را داشتند. بیشترین میزان محتوی اطلاعات چند شکلی (PIC) مربوط به آغازگرهای IS₁₁، IS₃، IS₁₃ و IS₉ بود، همچنین بیشترین میزان شاخص نشانگر (MI) مربوط به آغازگرهای IS₁₁، IS₃، IS₁₃ و IS₉ بود. این نشانگرها بهتر از سایر آغازگرها توانستند فاصله ژنتیکی جمعیت‌ها را مشخص کنند. آغازگر IS₁₆ با کمترین میزان محتوی اطلاعات چند شکلی (PIC) و شاخص نشانگر (MI) توانایی خوبی در جداسازی جمعیت‌ها نداشت. دیگر آغازگرها دارای حد متوسطی از محتوی اطلاعات چند شکلی (PIC) و شاخص نشانگر (MI) نسبت به دو گروه حداقل و حداکثر بودند.

جدول ۲- درصد چندشکلی، تعداد کل باند و محتوی اطلاعات چندشکلی در آغازگرهای مورد استفاده

شماره آغازگر	توالی آغازگر	مکان‌های		درصد چندشکلی	MI	PIC
		تکثیر شده	چند مکان‌های شکل			
IS ₁	5'- AC AC AC AC AC AC AC AC ACYA-3'	۴	۴	٪۱۰۰	۱/۳۰	۰/۳۲۵
IS ₃	5'- GA GA GA GA GA GA GA GAYC-3'	۷	۷	٪۱۰۰	۲/۶۹	۰/۳۸۵
IS ₅	5'- AG AG AG AG AG AG AG AGC-3'	۶	۵	٪۸۳/۳۳	۱/۸۸	۰/۳۷۶
IS ₉	5'- CT CT CT CT CT CT CT CTG-3'	۵	۵	٪۱۰۰	۲/۰۶	۰/۴۱۲
IS ₁₁	5'-ACACACACACACACACC-3'	۷	۷	٪۱۰۰	۲/۷۵	۰/۳۹۳
IS ₁₃	5'- AG AG AG AG AG AG AG AGYT-3'	۵	۵	٪۱۰۰	۲/۲۶	۰/۴۵۱
IS ₁₄	5'- GACA GACA GACA GACA -3'	۷	۵	٪۷۱/۴۲	۱/۵۴	۰/۳۰۸
IS ₁₆	5'-DBDACACACACACACA-3'	۳	۲	٪۶۶/۶۶	۰/۵۷	۰/۲۸۶
میانگین		۵/۵	۵	٪۹۰/۱۸	۱/۸۸	۰/۳۶۷

بررسی تنوع ژنتیکی ۱۷ جمعیت از یونجه ...

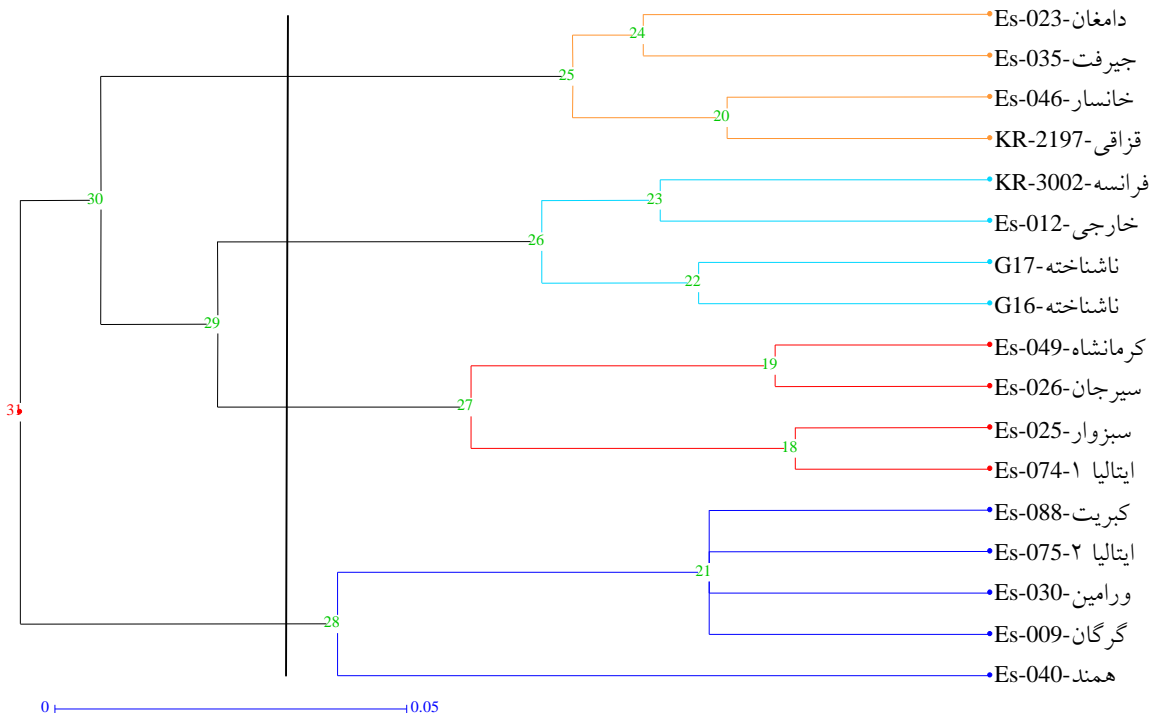
جدول ۳- ماتریس تشابه با استفاده ضریب تشابه دایس برای جمعیت‌های مورد بررسی با استفاده از نشانگر ISSR

جمعیت	منشأ	Es-026	KR-2197	Es-035	Es-023	Es-049	Es-074	Es-046	Es-009	Es-040	Es-030	Es-025	Es-075	Es-012	Es-088	KR-3002	G16
KR-2197	قزاقی	۰/۷۶۰															
Es-035	جیرفت	۰/۵۹۳	۰/۶۹۶														
Es-023	دامغان	۰/۶۹۷	۰/۶۶۷	۰/۷۱۴													
Es-049	کرمانشاه	۰/۷۸۸	۰/۵۳۹	۰/۶۴۳	۰/۷۳۳												
Es-074	ایتالیا ۱	۰/۷۴۲	۰/۷۴۱	۰/۶۶۷	۰/۶۴۰	۰/۶۶۷											
Es-046	خانسار	۰/۷۲۴	۰/۷۶۰	۰/۷۲۷	۰/۷۳۹	۰/۶۶۷	۰/۷۶۹										
Es-009	گرگان	۰/۶۹۴	۰/۶۵۱	۰/۶۲۹	۰/۷۱۸	۰/۷۴۱	۰/۶۹۸	۰/۶۳۴									
Es-040	همند	۰/۵۸۶	۰/۴۸۰	۰/۵۹۱	۰/۵۶۵	۰/۵۵۲	۰/۵۷۷	۰/۵۸۳	۰/۵۷۹								
Es-030	ورامین	۰/۷۰۲	۰/۷۳۵	۰/۶۰۵	۰/۷۱۱	۰/۶۲۱	۰/۶۶۷	۰/۶۸۱	۰/۷۳۲	۰/۶۳۸							
Es-025	سبزوار	۰/۶۷۹	۰/۵۴۲	۰/۶۱۹	۰/۵۰۰	۰/۷۴۱	۰/۸۰۰	۰/۶۵۲	۰/۷۲۲	۰/۶۵۲	۰/۵۷۸						
Es-075	ایتالیا ۲	۰/۶۴۴	۰/۶۶۷	۰/۵۳۳	۰/۶۸۱	۰/۷۱۴	۰/۷۱۷	۰/۶۱۲	۰/۶۶۷	۰/۶۹۴	۰/۷۵۰	۰/۵۹۶					
Es-012	خارجی	۰/۶۷۸	۰/۶۶۷	۰/۶۶۷	۰/۶۸۱	۰/۷۴۱	۰/۷۵۵	۰/۶۹۴	۰/۶۵۰	۰/۴۹۰	۰/۶۲۵	۰/۶۸۱	۰/۶۴۰				
Es-088	کبریت	۰/۷۳۷	۰/۷۳۵	۰/۵۱۲	۰/۶۲۲	۰/۶۴۰	۰/۶۶۷	۰/۶۸۱	۰/۷۵۰	۰/۵۵۳	۰/۷۵۰	۰/۵۳۳	۰/۷۵۰	۰/۵۸۳			
KR-3002	فرانسه	۰/۶۰۷	۰/۵۸۳	۰/۶۶۷	۰/۵۹۱	۰/۷۶۹	۰/۶۴۰	۰/۶۹۶	۰/۷۰۳	۰/۵۶۵	۰/۵۷۸	۰/۵۹۱	۰/۵۹۶	۰/۷۲۳	۰/۶۲۲		
G16	ناشناخته	۰/۶۰۰	۰/۶۹۸	۰/۶۲۳	۰/۵۸۵	۰/۷۲۷	۰/۶۶۷	۰/۶۱۹	۰/۶۲۹	۰/۶۳۶	۰/۶۳۴	۰/۵۸۵	۰/۶۸۱	۰/۶۹۸	۰/۵۰۰	۰/۷۱۴	
G17	ناشناخته	۰/۷۰۲	۰/۶۹۴	۰/۵۵۸	۰/۶۶۷	۰/۷۲۰	۰/۶۶۷	۰/۶۸۱	۰/۷۱۸	۰/۵۹۶	۰/۷۳۹	۰/۵۳۳	۰/۶۲۵	۰/۶۶۷	۰/۶۰۹	۰/۷۱۱	۰/۷۴۴

تجزیه خوشه‌ای

دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA بر اساس ضریب تشابه دایس و برش دندروگرام با خط برش باعث گروه‌بندی جمعیت‌ها در ۴ گروه شد (شکل ۲). گروه اول شامل جمعیت‌های Es-023, Es-035, Es-023 و Es-046, Es-035, Es-023

KR-2197 بود. در گروه دوم جمعیت‌های Es-KR-3002, Es-012, G-16 و G-17 قرار گرفتند. گروه سوم شامل جمعیت‌های Es-049, Es-026, Es-025 و Es-074 بود. جمعیت‌های Es-088, Es-075, Es-030, Es-009 و Es-040 در گروه چهارم قرار گرفتند.



شکل ۲- دندروگرام حاصل از داده‌های نشانگر ISSR برای جمعیت‌های مورد مطالعه

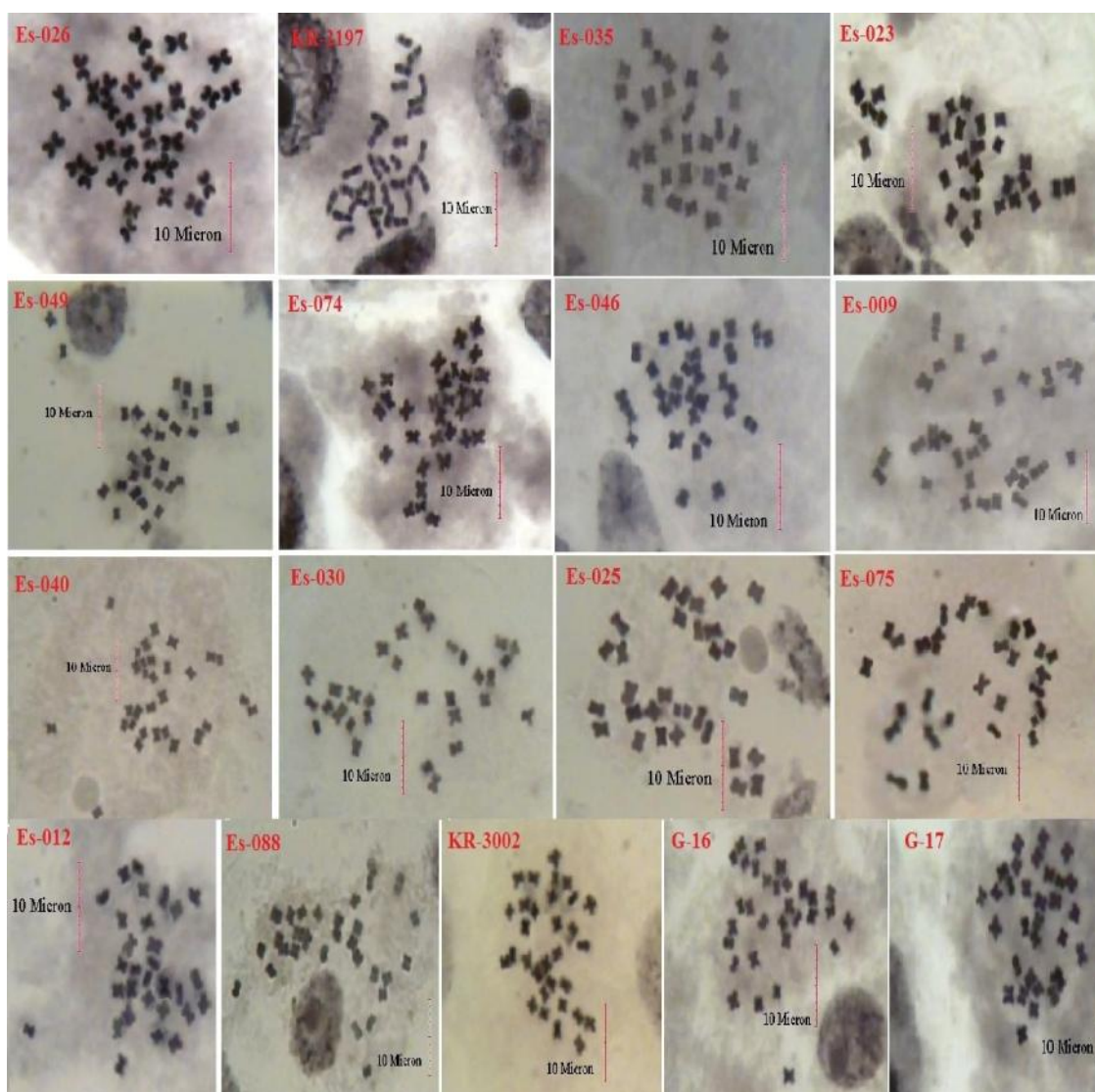
تنوع سیتوژنتیکی

شکل ۳ تصاویر سلول‌های متافازی جمعیت‌های مورد مطالعه را نشان می‌دهد. برای هر کاریوتیپ سطح پلوئیدی، تعداد کل کروموزوم، تعداد کروموزوم پایه (X)، تعداد ماهواره، کروموزوم ماهواره‌دار به همراه فرمول کاریوتیپی (K.F) تعیین شد و نتایج حاصل در جدول ۴ ارائه شد. تمام جمعیت‌های مورد بررسی تتراپلوئید بودند و تعداد کروموزوم پایه در تمامی جمعیت‌های مورد مطالعه ۸ بود، بنابراین از نظر تعداد کروموزوم پایه و سطح پلوئیدی تنوع بین جمعیت‌ها مشاهده نشد. فرمول کاریوتیپی بر اساس روش Levan و همکاران (۱۹۶۴) برای تمام جمعیت‌ها 16m بود. در اکثر

جمعیت‌های مورد بررسی ماهواره مشاهده نشد. تنها در جمعیت Es-046 یک ماهواره به طول ۰/۵۷ میکرون، در جمعیت Es-009 یک ماهواره به طول ۰/۶۶ میکرون و در جمعیت KR-2197 دو ماهواره به طول‌های ۰/۹۵ و ۱/۰۸ میکرون مشاهده شد. بر اساس جدول دوطرفه Stebbins (1971) جمعیت‌های مورد مطالعه در کلاس‌های تقارن مربوطه قرار گرفتند، طبق این جدول تمام جمعیت‌ها در کلاس ۱A قرار گرفتند. بر اساس شاخص نامتقارن بودن درون کروموزومی (A1) (Romero-Zarco, 1986) و درصد شکل کلی کروموزوم (%TF) (Huziwarra, 1962) جمعیت‌های Es-030, Es-088, Es-046 و KR-2197 با بیشترین

اساس شاخص نامتقارن بودن بین کروموزومی (A_2) و پارامتر اختلاف طول نسبی بزرگترین کروموزوم و کوچکترین کروموزوم دارای بیشترین تکامل کاریوتیمی بودند. با توجه به ارزش نسبی کروماتین (VRC) بیشترین میزان کروماتین به جمعیت‌های KR-2197, Es-026, Es-088, Es-074 و Es-046 اختصاص داشت، بنابراین این جمعیت‌ها دارای میزان کروماتین بیشتر و در نتیجه تکامل کاریوتیمی بیشتری بودند. کمترین مقدار آن به جمعیت‌های Es-040 و Es-012 اختصاص داشت.

میزان شاخص عدم تقارن درون کروموزومی (A_1) و کمترین درصد شکل کلی کروموزوم (%TF)، دارای نامتقارن‌ترین کروموزوم‌ها بودند و جمعیت‌های Es-026, G17, G16, Es-009 و Es-040 دارای متقارن‌ترین کروموزوم‌ها بودند. برای شاخص نامتقارن بودن بین کروموزومی (A_2) و پارامتر اختلاف طول نسبی بزرگترین کروموزوم و کوچکترین کروموزوم (DRL) (Romero-Zarco, 1986) مشاهده شد که جمعیت G16 و Es-088 دارای کمترین اختلاف طولی بین کروموزومی (DRL) بود و جمعیت‌های Es-040, Es-025 و KR-2197 با داشتن نامتقارن‌ترین کاریوتیپ بر



شکل ۳- تصاویر سلول متافازی جمعیت‌های مورد بررسی

جدول ۴- پارامترهای تقارن کاریوتیپی جمعیت‌های مورد بررسی

جمعیت	منشأ	A ₁	A ₂	SC	DRL	%TF	VRC
Es-026	سیرجان	۰/۱۲۳	۰/۱۳۲	1A	۳/۱۵	۴۶/۶۴	۲/۷۴
KR-2197	قزاقی	۰/۳۱۵	۰/۱۸۳	1A	۴/۱۱	۳۹/۲۳	۲/۹۸
Es-035	جیرفت	۰/۲۱۹	۰/۱۷۰	1A	۳/۹۷	۴۳/۹۲	۲/۱۸
Es-023	دامغان	۰/۲۱۹	۰/۱۶۷	1A	۴/۰۴	۴۳/۹۷	۲/۲۱
Es-049	کرمانشاه	۰/۲۶۶	۰/۱۶۳	1A	۳/۶۰	۴۲/۲۵	۲/۲۲
Es-074	ایتالیا ۱	۰/۲۵۲	۰/۱۶۸	1A	۳/۹۰	۴۲/۷۶	۲/۴۵
Es-046	خانسار	۰/۲۸۶	۰/۱۸۰	1A	۳/۶۹	۴۰/۷۱	۲/۴۰
Es-009	گرگان	۰/۱۷۳	۰/۱۵۲	1A	۳/۴۹	۴۴/۹۶	۲/۳۴
Es-040	همند	۰/۱۹۴	۰/۲۰۵	1A	۴/۷۷	۴۴/۵۶	۱/۹۷
Es-030	ورامین	۰/۲۷۱	۰/۱۷۶	1A	۴/۲۳	۴۲/۰۱	۲/۳۴
Es-025	سبزوار	۰/۲۳۶	۰/۱۸۴	1A	۴/۵۸	۴۳/۱۳	۲/۰۴
Es-075	ایتالیا ۲	۰/۲۱۱	۰/۱۶۴	1A	۰۴/۰۴	۴۳/۷۳	۲/۲۸
Es-012	خارجی	۰/۲۶۱	۰/۱۵۰	1A	۳/۱۷	۴۲/۴۲	۱/۹۲
Es-088	کبریت	۰/۲۸۲	۰/۱۱۸	1A	۲/۲۹۰	۴۱/۶۵	۲/۵۴
KR-3002	فرانسه	۰/۲۵۱	۰/۱۳۷	1A	۳/۲۷	۴۲/۶۴	۲/۳۶
G16	ناشناخته	۰/۱۳۳	۰/۱۲۵	1A	۲/۹۹	۴۶/۴۷	۲/۰۵
G17	ناشناخته	۰/۱۲۹	۰/۱۵۲	1A	۳/۸۷	۴۰/۶۰	۲/۱۲

تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها

به منظور تعیین وجود یا عدم وجود تفاوت معنی دار در بین جمعیت‌ها از تجزیه واریانس بر پایه طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار بر اساس صفات کاریوتیپی استفاده شد (جدول ۵). در بین جمعیت‌ها از نظر صفات طول کل (TL)، طول بازوی بلند (LA) و کوتاه (SA) کروموزوم، شاخص

سانترومیری (CI) و نسبت بازوی بلند به کوتاه (AR) بر اساس تجزیه واریانس اختلاف معنی داری در سطح یک درصد وجود داشت. با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن جمعیت‌ها برای صفات مورد بررسی، در سطح پنج درصد مقایسه و دسته‌بندی شدند (جدول ۶).

جدول ۵- میانگین مربعات تجزیه واریانس صفات کاریوتیپی

AR	CI	SA	LA	TL	درجه آزادی	منابع تغییرات
۰/۰۳۹*	۰/۰۰۲**	۰/۰۴۷**	۰/۱۱۳**	۰/۲۹۹**	۱۶	جمعیت
۰/۰۰۵	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۶	۰/۰۱۴	۰/۰۳۶	۵۱	خطا
۵/۱۵	۲/۸۴	۷/۷۷	۹/۲۶	۸/۲۸		ضریب تغییرات (%CV)
۱/۳۱	۰/۴۳	۰/۹۹	۱/۲۹	۲/۳۰		میانگین

** میانگین مربعات تیمار در سطح ۱٪ معنی دار است، * میانگین مربعات تیمار در سطح ۵٪ معنی دار است

TL = طول کل کروموزوم، LA = بازوی بلند، SA = بازوی کوتاه، CI = شاخص سانترومیری، AR = نسبت بازوی بلند به بازوی کوتاه

تقارن درون کروموزومی بر اساس این شاخص مربوط به جمعیت KR-2197 بود و با دیگر جمعیت‌ها در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار داشت (گروه F). جمعیت‌های Es-046 و Es-088 بعد از جمعیت KR-2197 دارای کمترین شاخص سانترومیری و کمترین عدم تقارن درون کروموزومی با توجه به این شاخص بودند و در گروه E قرار داشتند، که با جمعیت‌های Es-025، Es-074، Es-012، Es-049 و Es-030 در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار نداشتند. برای صفت نسبت بازوی بلند به کوتاه (AR) بیشترین میزان مربوط به جمعیت KR-2197 بود که با جمعیت‌های Es-046، Es-088 و Es-030 در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار نداشت. بنابراین جمعیت‌های مذکور بیشترین عدم تقارن درون کروموزومی با توجه به شاخص نسبت بازوی بلند به کوتاه را داشتند. کمترین نسبت بازوی بلند به کوتاه متعلق به جمعیت‌ها Es-026 بود که با جمعیت‌های Es-009، G17، G16 و Es-049 در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار نداشت.

تجزیه خوشه‌ای

دندروگرام به دست آمده از تجزیه خوشه‌ای به روش Ward در شکل ۴ ارائه شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود با برش دندروگرام ژنوتیپ‌ها در ۴ خوشه قرار گرفتند. طبق دندروگرام خوشه اول شامل ۵ ژنوتیپ (Es-025، Es-012، Es-040، G-16 و G-17)، خوشه دوم شامل ۵ ژنوتیپ (Es-074، Es-088، Es-046، Es-030 و KR-3002)، خوشه سوم شامل ۵ ژنوتیپ (Es-075، Es-009، Es-049، Es-023 و Es-035) و خوشه چهارم شامل ۲ ژنوتیپ (Es-026 و KR-2197) بودند.

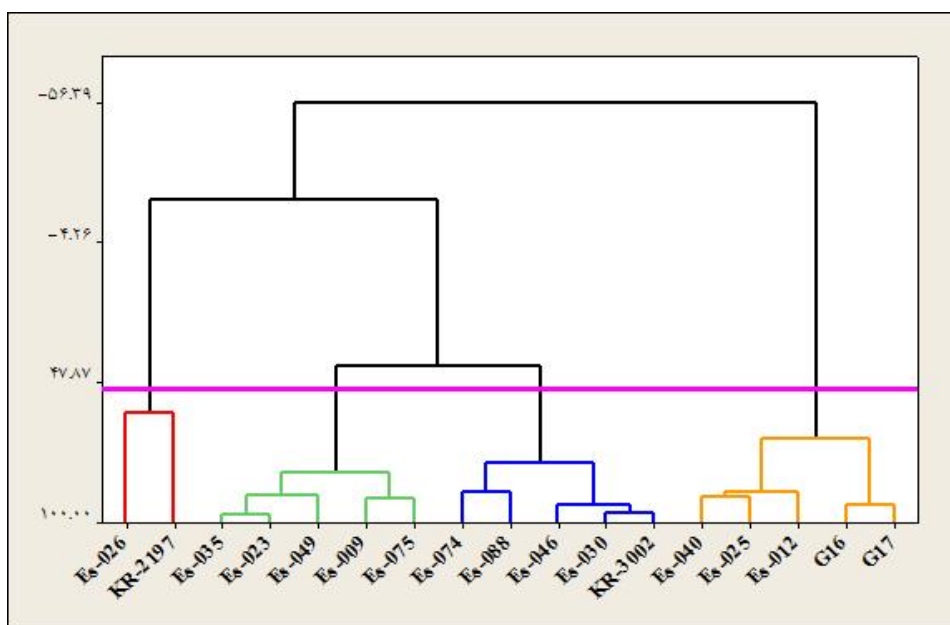
با توجه به مقایسه میانگین صفت طول کل کروموزوم (TL) مشاهده شد که جمعیت KR-2197 با داشتن بلندترین کروموزوم (۲/۹۸ میکرون) در گروه A قرار گرفت، که با جمعیت Es-026 اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد نداشت. از طرف دیگر جمعیت Es-012 دارای کوتاه‌ترین کروموزوم (با میانگین ۱/۹۲ میکرون) بود و با جمعیت‌های Es-049، Es-023، Es-035، G17، G16، Es-025 و Es-040 اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد نداشت. برای صفت طول بازوی بلند (LA) جمعیت KR-2197 با داشتن بلندترین طول بازوی بلند (۱/۷۳ میکرون) در گروه A قرار گرفت و با دیگر جمعیت‌ها اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد نداشت. جمعیت Es-088 با داشتن متوسط طول بازوی بلند ۱/۴۸ میکرون در گروه B قرار گرفت و با جمعیت‌های Es-026، Es-074، Es-046، Es-030، Es-040 و Es-012 (به ترتیب با طول ۱/۱۳، ۱/۱۱، ۱/۱۰ و ۱/۰۹ میکرون) اختصاص داشت و در گروه F قرار گرفتند که با جمعیت‌های Es-075، Es-049، Es-009، Es-023، Es-035 و Es-025 اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد نداشتند. برای طول بازوی کوتاه (SA)، جمعیت Es-026 دارای بلندترین میانگین طول بازوی کوتاه (۱/۲۸ میکرون) بود و در گروه A قرار گرفت، که با جمعیت KR-2197 اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد نداشت. جمعیت Es-012 دارای کوتاه‌ترین طول بازوی کوتاه (۰/۸۲ میکرون) بود و با جمعیت‌های Es-040 و Es-025 اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد نداشت. برای صفت شاخص سانترومیری (CI) بیشترین میزان به جمعیت‌های Es-026، G17 و G16 تعلق گرفت و در گروه A قرار داشتند و با جمعیت Es-009 در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار نشان نداشتند. کمترین میزان شاخص سانترومیری (CI) یا به عبارت دیگر بیشترین عدم

جدول ۶- مقایسه میانگین صفات کاریوتیپی به روش دانکن در سطح ۵٪

جمعیت	منشأ	TL(μm)		LA(μm)		SA(μm)		CI	AR		
Es-026	سیرجان	۲/۷۴	ab	۱/۴۶	bc	۱/۲۸	a	۰/۴۶۸	a	۱/۱۴	g
KR-2197	قزاقی	۲/۹۸	a	۱/۷۳	a	۱/۱۷	ab	۰/۳۹۶	f	۱/۵۰	a
Es-035	جیرفت	۲/۱۸	defgh	۱/۲۲	def	۰/۹۶	cd	۰/۴۳۸	bcd	۱/۲۹	cde
Es-023	دامغان	۱/۲۱	defgh	۱/۲۴	def	۰/۹۷	cd	۰/۴۳۹	bcd	۱/۲۹	cde
Es-049	کرمانشاه	۲/۲۲	defgh	۱/۲۸	cdef	۰/۹۴	cd	۰/۴۲۳	de	۱/۳۸	bcd
Es-074	ایتالیا ۱	۲/۴۵	cd	۱/۴۰	bcd	۱/۰۵	c	۰/۴۲۸	cde	۱/۳۵	bcd
Es-046	خانسار	۲/۳۸	cde	۱/۳۹	bcd	۰/۹۸	cd	۰/۴۱۴	e	۱/۴۲	ab
Es-009	گرگان	۲/۳۴	cdef	۱/۲۸	cdef	۱/۰۵	c	۰/۴۵۲	ab	۱/۲۲	efg
Es-040	همند	۱/۹۷	gh	۱/۰۹	f	۰/۸۸	de	۰/۴۴۵	bc	۱/۲۷	def
Es-030	ورامین	۲/۳۴	cdef	۱/۳۶	bcde	۰/۹۸	cd	۰/۴۲۱	de	۱/۳۹	abc
Es-025	سبزواری	۲/۰۴	fgh	۱/۱۶	ef	۰/۸۸	de	۰/۴۳۳	bcde	۱/۳۴	bcd
Es-075	ایتالیا ۲	۲/۲۸	cdefg	۱/۲۸	cdef	۱/۰۰	cd	۰/۴۴۰	bcd	۱/۲۹	cde
Es-012	خارجی	۱/۹۲	h	۱/۱۱	f	۰/۸۲	e	۰/۴۲۵	de	۱/۳۷	bcd
Es-088	کیریت	۲/۵۴	bc	۱/۴۸	b	۱/۰۶	bc	۰/۴۱۷	e	۱/۴۱	ab
KR-3002	فرانسه	۲/۳۶	cdef	۱/۳۵	bcde	۱/۰۱	cd	۰/۴۲۷	cde	۱/۳۶	bcd
G16	ناشناخته	۲/۰۵	fgh	۱/۱۰	f	۰/۹۵	cd	۰/۴۶۵	a	۱/۱۷	fg
G17	ناشناخته	۲/۱۲	efgh	۱/۱۳	f	۰/۹۹	cd	۰/۴۶۵	a	۱/۱۷	fg

صفات دارای حروف مشترک علامت عدم وجود معنی دار در سطح ۵ درصد احتمال

TL = طول کل کروموزوم، LA = بازوی بلند، SA = بازوی کوتاه، CI = شاخص سانتومری، AR = نسبت بازوی بلند به بازوی کوتاه

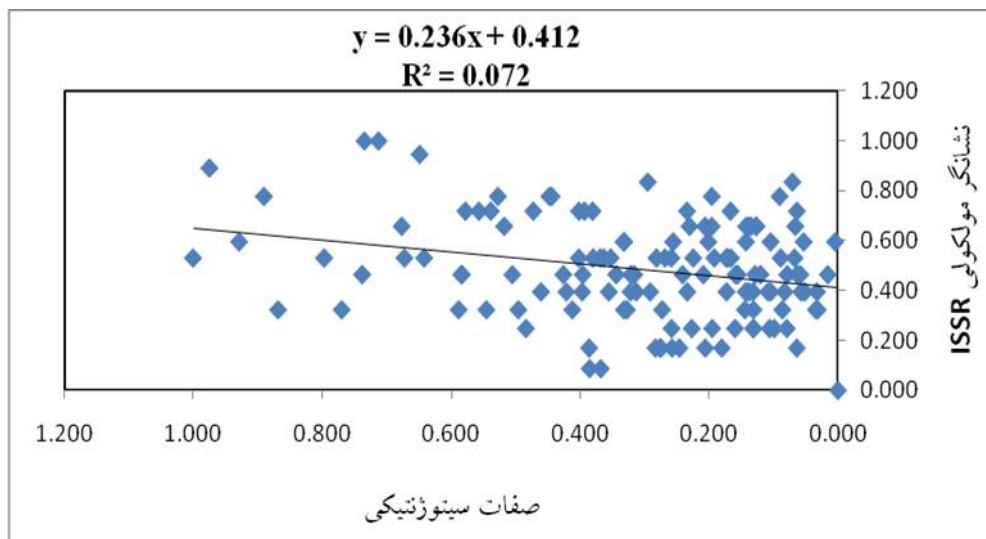


شکل ۴- دندروگرام تجزیه کلاستر صفات کاریوتیپی برای جمعیت‌های مورد مطالعه با استفاده از روش Ward

ارتباط میان نشانگرها

ضریب همبستگی بین ماتریس‌های فاصله ژنتیکی نشانگر مولکولی ISSR و صفات سیتوژنتیکی ژنوتیپ‌های یونجه با استفاده از آزمون مانتل (Mantel, 1976) محاسبه

شد. نتایج نشان داد که همبستگی بین ماتریس‌های فاصله بسیار کم بود (شکل ۵) و از نظر آماری نیز این همبستگی معنی‌دار نبود ($R^2=0.072$, $P=0.1$).



شکل ۵- پراکندگی همبستگی بین ماتریس‌های فاصله ژنتیکی بر اساس نشانگر ISSR و صفات سیتوژنتیکی

بحث

محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) از صفر تا نیم در نشانگرهای غالب متغیر است و هرچه این عدد بزرگتر باشد بیانگر فراوانی بیشتر چندشکلی برای آن جایگاه در جمعیت‌های تحت بررسی می‌باشد. بر اساس شاخص‌های محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) و شاخص نشانگر (MI) چهار آغازگر IS3, IS11, IS13 و IS9 بهتر از سایر آغازگرها توانستند چند شکلی را در بین جمعیت‌ها نشان دهند. بنابراین پیشنهاد می‌شود از آغازگرهای IS3, IS11, IS13 و IS9 برای تجزیه و تحلیل مجموعه ژرم‌پلاسم دیگر جمعیت‌های یونجه در تحقیقات بعدی استفاده کرد. بر اساس پرایمرهای مورد بررسی جمعیت‌های Es-074 با Es-025, Es-026 با Es-049, Es-049 با KR-3002 و Es-074 با Es-046 بیشترین تشابه ژنتیکی و جمعیت‌های KR-2197 با Es-040, Es-023 با Es-025, Es-040 با Es-012 و Es-088 با G-16 بیشترین فاصله ژنتیکی را داشتند. در بررسی Shahnejat Bousheri و همکاران (۲۰۰۸) و

نتایج این بررسی نشان داد که آغازگرهای ISSR ابزار مناسبی جهت بررسی تنوع ژنتیکی در بین جمعیت‌های یونجه می‌باشد و با توجه به آغازگرهای مورد استفاده تنوع ژنتیکی خوبی در میان جمعیت‌های مورد مطالعه مشاهده شد. در این تحقیق مشخص شد که با استفاده از تکنیک (ISSR) می‌توان در زمان کم، الگوی ژنتیکی جمعیت‌های یونجه را نسبت به همدیگر مشخص ساخت. از این تکنیک برای بررسی تنوع در بسیاری از گیاهان استفاده شده است. به گونه‌ای که آنها در تحقیقی بر روی ۱۲ جمعیت یونجه آسیایی (*Medicago sativa*) از نشانگرهای SSR استفاده کردند و تنوع خوبی را در میان جمعیت‌های مورد بررسی مشاهده کردند. همچنین Bahar و همکاران (۲۰۰۶) تنوع ژنتیکی جمعیت‌های بومی یونجه را با استفاده از نشانگرهای ریز ماهواره (ESTS) مورد ارزیابی قرار دادند و پلی‌مورفیسم در بین جمعیت‌ها را بالا گزارش کردند.

و همکاران (۲۰۰۱) بر روی کاربوتیپ ژرم پلاسما یونجه‌های تتراپلوئید آفریقایی (*Medicago sativa*) نتیجه گرفتند که کاربوتیپ جمعیت‌ها شامل یک مجموعه از کروموزوم‌های دارای ماهواره، سه مجموعه از کروموزوم‌های متاسانتریک و چهار مجموعه از کروموزوم‌های ساب‌متاسانتریک می‌باشد. براساس جدول دوطرفه Stebbins جمعیت‌های مورد مطالعه در کلاس‌های تقارن مربوطه قرار گرفتند، طبق این جدول تمام جمعیت‌ها در کلاس ۱A قرار گرفتند. بنابراین مشاهده شد که بر اساس جدول دوطرفه Stebbins جمعیت‌های مورد بررسی تقارن کروموزومی بالایی داشتند و این شاخص نتوانست تنوع بین جمعیت‌های این گونه را نشان دهد و بر این اساس گونه *M. sativa* در پایین‌ترین رده تکاملی بود. همچنین Mortazavi (۲۰۰۷) در بررسی جمعیت‌های یونجه تنوع معنی‌دار برای صفات کاربوتیپی گزارش کرد و بیان داشت که تمام جمعیت‌ها بر اساس جدول دوطرفه Stebbins در کلاس IA قرار داشتند و کاربوتیپ متقارنی دارند. به‌منظور بهتر مشخص کردن تنوع در تقارن درون کروموزومی و بین کروموزومی، پارامترهای شاخص نامتقارن بودن درون کروموزومی (A1)، شاخص نامتقارن بودن بین کروموزومی (A2)، اختلاف دامنه طول نسبی بزرگترین کروموزوم از کوچکترین کروموزوم (DRL)، درصد شکل کلی (%TF) محاسبه شد. جمعیت‌های Es-030، Es-088، Es-046 و KR-2197 با بیشترین میزان A1 و کمترین %TF، دارای نامتقارن‌ترین کروموزوم‌ها بودند و از نظر تکاملی با توجه با این پارامترها در درجه بالاتری قرار گرفتند و جمعیت‌های Es-026، G16، G17، Es-009 و Es-040 دارای متقارن‌ترین کروموزوم‌ها بودند و با توجه به این پارامترها در پایین‌ترین مرتبه تکاملی در بین جمعیت‌های مورد بررسی قرار داشتند. جمعیت G16 و Es-088 دارای کمترین اختلاف طولی بین کروموزومی بود و بر اساس این شاخص‌ها متقارن‌ترین کاربوتیپ را داشت بنابراین از نظر تکاملی در پایین‌ترین درجه قرار گرفت. جمعیت‌های Es-040، Es-025 و KR-2197 با داشتن نامتقارن‌ترین کاربوتیپ بر اساس شاخص DRL و A2 دارای بیشترین تکامل کاربوتیپی

Ghanavati و همکاران (۲۰۰۶) با استفاده از نشانگر RAPD تنوع ژنتیکی و روابط خویشاوندی ارقام و توده‌های یونجه ایران مورد بررسی قرار گرفت و هر دو تحقیق نشانگر RAPD را جهت بیان تنوع ژنتیکی مناسب ارزیابی کردند. در نتایج تجزیه کلاستر همبستگی خوبی بین تنوع ژنتیکی و تنوع جغرافیایی مشاهده نشد، یعنی نمونه‌هایی که از نظر جغرافیایی نزدیک به همدیگر قرار گرفتند لزوماً از نظر ژنتیکی تشابه بیشتری را نشان نمی‌دهند. این نتایج با تحقیقات Bolourchian و همکاران (۲۰۱۳) مطابقت داشت. ایشان با استفاده از نشانگر ISSR تنوع ژنتیکی بین ۱۹ رقم یونجه را بررسی و تنوع بالایی را در آنها گزارش کردند، همچنین با استفاده از تجزیه کلاستر و تجزیه به مختصات اصلی اقدام به گروه‌بندی جمعیت‌ها کردند.

در یک جمع‌بندی کلی در مطالعات سیتوژنتیکی می‌توان بیان داشت که جمعیت‌های مورد بررسی دارای کاربوتیپ متقارن بودند و در بین آنها تنوع معنی‌دار برای صفات کاربوتیپی وجود داشت، بنابراین صفات کاربوتیپی به‌خوبی تنوع را در بین جمعیت‌ها نشان داد. با توجه به محاسبه صفات مختلف کاربوتیپی جمعیت‌های یونجه، تمام جمعیت‌های مورد بررسی تتراپلوئید بودند و تعداد کروموزوم پایه در تمامی جمعیت‌های مورد مطالعه ۸ بود، که Bauchan و همکاران (۱۹۹۵) نیز یونجه را یک گیاه تتراپلوئید معرفی کردند، که دارای ۸ دسته از کروموزوم‌های ۴ تایی مشابه هم هستند. همچنین Bauchan و Azhar (۱۹۹۸) عدد کروموزومی پایه جنس یونجه را برابر با $x=8$ و $y=7$

گزارش کردند. فرمول کاربوتیپی برای تمام جمعیت‌ها یکسان بود. بنابراین می‌توان بیان داشت که کاربوتیپ تمام جمعیت‌ها از کروموزوم متاسانتریک تشکیل شده است و از نظر فرم کروموزومی تنوع درون گونه‌ای مشاهده نشد و جمعیت‌های مورد مطالعه دارای کروموزوم‌های متقارنی بودند. در اکثر جمعیت‌های مورد بررسی ماهواره مشاهده نشد. تنها در سه جمعیت ماهواره مشاهده شد، بنابراین از نظر تعداد، طول و محل قرار گرفتن ماهواره در بین جمعیت‌ها تنوع چندانی وجود نداشت. در بررسی Azhar Hossain

ارزیابی تنوع مورفولوژیکی نمونه‌ها، امکان شناسایی جمعیت‌های مناسب جهت توسعه و بهره‌گیری از آن وجود خواهد داشت.

منابع مورد استفاده

- Azhar Hossain, M. and Bauchan, G.R., 2001. Distribution and characterization of heterochromatic DNA in the tetraploid African populations of alfalfa Genome. *Crop Science*, 41: 1921-1926.
- Bahar, M., Ghobadi, S., Erfani Moghadam, V., Pamchi, A., Talebibadaf, M., Kaboli, M. and Mokhtarzade, A., 2006. Evaluation of genetic diversity of local lucerne population using ESTS markers. *Journal of Science and Technology in Agriculture and Natural Resources*, 2: 142-153.
- Bauchan, G.R., Small, E., Brooks, B. and Auricht, G.C., 1995. A systematic comparison of early-and late-flowering forms of *Medicago scutellata*. *Canadian Journal of Botany*, 71:183-192.
- Bauchan, G.R. and Azhar Hossain, M., 1998. Karyotypic analysis of C-banded chromosomes of diploid alfalfa: *Medicago sativa* ssp. *caerulea* and ssp. *falcata* and their hybrid. *Journal of Heredity*, 89:191-193.
- Bolourchian, F., Farshadfar, M., Safari, H. and Shirvani, H., 2013. Evaluation of genetic diversity in different genotypes of (*Medicago Sativa* L.) using ISSR markers. *International Journal of Farming and Allied Sciences*, 2: 995-960.
- Farshadfar, M., Kissimon, T. and Sutka, T., 1995. Genetic distance between *Triticum timopheeyi* zhuk, *T. araraticum* takubz. *Plant Breeding*, 114: 401-405.
- Ghanavati, F., Mozafari, J. and Kazempour, Sh., 2006. Familiar relationship between lucerne genuse on Iran based on RAPD molecular marker. *Pajouhesh & Sazandegi*, 66: 2-12 (In Persian).
- Gupta, P.K., 1995. *Cytogenetic*. Rastogiand Company. Maruat India, 3-4.
- Hamza, S., Hamida, W.B., Rebai, A. and Hrrabi, M., 2004. SSR-based genetic diversity assessment among Tunisian winter barley and relationship with morphological traits. *Euphytica*, 135:107-118.
- Hou, Y., Yan, Z., Wei, Y., 2005. Genetic diversity in barely from west China based on RAPD and ISSR nalysis. *Barely Genetics Newsletter*, 35:9-22.
- Huziwaru, Y., 1962. Karyotype analysis in some genera of Composite. VIII. Further studies on the chromosome of aster. *American Journal of Botany*, 49: 116-119.

بودند. همچنین Sharyat (۲۰۰۱)، در بررسی تنوع ژنتیکی ۱۲ جمعیت یونجه یکساله جهت ارزیابی تقارن کاریوتیپ‌ها از کمیت‌هائی نظیر درصد شکل کلی (TF%) و اختلاف طول نسبی کروموزوم (DRL) استفاده کرد و با استفاده از جدول Stebbins تقارن کاریوتیپی جمعیت‌ها را محاسبه کرد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد در بین جمعیت‌ها از نظر صفات طول کل (TL)، طول بازوی بلند (LA) و کوتاه (SA) کروموزوم، شاخص سانترومری (CI) و نسبت بازوی بلند به کوتاه (AR) بر اساس تجزیه واریانس اختلاف معنی‌داری در سطح ۱٪ وجود داشت. بنابراین برای صفات اندازه‌گیری شده تنوع معنی‌داری بین ژرم پلاسما مورد بررسی برای صفات کاریوتیپی وجود دارد. همچنین بر اساس مقایسه میانگن دانگن جمعیت‌ها برای صفات کاریوتیپی در کلاس آماری مختلفی قرار گرفتند. همچنین Sharyat (۲۰۰۱)، در بین جمعیت‌های ۱۲ گونه یونجه یکساله برای صفات کاریوتیپی اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد گزارش کرد. رابطه همبستگی بین ماتریس فاصله صفات کاریوتیپی و نشانگر مولکولی با استفاده از آزمون مانتل نشان داد که همبستگی بین صفات $R^2 = 72\%$ و غیر معنی‌دار بود. گزارش‌های متناقضی در زمینه وجود یا عدم وجود رابطه بین نتایج حاصل از نشانگرها وجود دارد مانند، بررسی Schaut و همکاران (۱۹۹۷) که همبستگی غیر معنی‌داری را در بین صفات زراعی و مولکولی جو گزارش کردند. همچنین Hamza و همکاران (۲۰۰۴) ارتباط بالایی را بین نشانگر مولکولی و ریخت‌شناسی در جو گزارش کردند. در مطالعه Mirzaie-Nodoushan و همکاران (۲۰۰۶) بر روی آویشن بین طول کل کروموزوم (TL) و اسانس ارتباط منفی مشاهده شد ولی طول کل کروموزوم از طریق طول برگ اثر بالایی در تولید اسانس داشت. در نهایت با توجه به نتایج به‌دست آمده شناسایی تنوع ژنتیکی در برنامه‌ریزی جهت مدیریت ژرم‌پلاسما یونجه در ایران جهت تدوین برنامه‌های اصلاحی مفید خواهد بود. با توجه به این که هر کدام از این شاخص‌ها برای تعیین تنوع ژنتیکی دارای نقاط ضعف و قوتی هستند، لذا با بهره‌گیری از نتایج مولکولی، سیتوژنتیکی و

- its application in plant breeding. *Euphytica*, 128:9-17.
- Rezaei, A., 2001. Lucerne Breeding. Centre of University Publishing. Tehran, 233pp, (In Persian).
 - Romero-Zarco, C., 1986. A new method for estimating karyotype asymmetry. *Taxonomy*, 35: 526-530.
 - Ronald, L. and Indra, K., 2001. NA-Based Markers in Plants. Kluwer Academic Publisher.
 - Schaut, J.W., Qi, X. and Stam, P., 1997. Association between relationship measures based on AFLP markers, pedigree data and morphological traits in barley. *Theoretical and Applied Genetics*, 95: 1161-1168.
 - Shahnejat Bousheri, A., Fatahi, H.A., Yazdi Samadi, B., 2008. Study of genetic variation among varieties and population of lucerne based on RAPD markers. *Modern Genetics*, 3: 35-43 (In Persian).
 - Sharyat, A., 2001. Study of genetic variability of annual lucerne by cytogenetic, electrophoretic and morphological traits. M.Sc. thesis, Sistan and Balouchestan University (In Persian).
 - Sicard, D., Nanni, L., Porfiri, O., Bulfon, D., and Papa, R., 2005. Genetic diversity of *Phaseolus vulgaris* L. and *P. coccineus* L. landraces in central Italy. *Plant Breeding*, 124: 464-472.
 - Stebbins, G.L., 1971. Chromosome Evolution in Higher Plants. Edward Arnold Publisher. LTD. London, pp.216.
 - Terzopoulos, P.J. and Bebeli, P.J., 2008. Genetic diversity analysis of Mediterranean faba bean (*Vicia faba* L.) with ISSR markers. *Field Crops Research*, 108:39-44.
 - Torres, A.M., Weeden, N.F. and Martin, A., 1993. Linkage among isozyme, RFLP and RAPD markers in *Vicia faba*. *Theoretical and Applied Genetics*, 85: 935-945.
 - Tucak, M., Popovic, S., Cupic, T., Grljusic, S., Bolaric, S., and Kozumplik, V., 2008. Genetic diversity of alfalfa (*Medicago* spp.) estimated by molecular markers and morphological characters. *Periodicum Biologorum*, 110: 243-249.
 - Vern, L.M. and Donald, L., 2006. Testing alfalfa for its feeding value. Division of Agriculture and Natural Resources. University of California. Rep, 109.
 - Levan, A., Fedga, K. and Sandberg, A.A., 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201-220.
 - Majd, A. and Sharyatzade, M.A., 2001. Molecular Biology, Aeyj publisher, Teharan, 731pp (In Persian).
 - Mantel, N., 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27: 209-220.
 - Mengoni, A., Gori, A. and Bazzicalupo, M., 2000. Use of RAPD and microsatellite (SSR) variation to assess genetic relationships among populations of tetraploid alfalfa, *Medicago sativa*. *Plant Breeding*, 119:311-317.
 - Michaud, R., Tremblay, G.F., Belanger, G. and Michaud, M., 1990. Proteolysis in alfalfa silages made from different cultivars. *Journal Agriculture and Agri-Food Canada, Soils and Crops Research and Development Center*, 2560 Hochelaga blvd, Sainte-Foy, Quebec, Canada, G1V 213.
 - Michaud, R., Tremblay, G.F., Belanger, G. and Michaud, J., 1991. *Agriculture and Agri-Food Canada, Soils and Crops Research and Development Center*, 2560 Hochelaga blvd, Sainte-Foy, Quebec, Canada, G1V 213.
 - Mirzaie-Nodoushan, H., Mehrpur, Sh., Rezaie, M. and Rashvand, S., 2002. Primary karyotypic investigation on several populations of *Aloe litoralis*. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 9: 49-84, (In Persian).
 - Mirzaie -Nodoushan, H., Mehrpur, Sh. and Sifidkon, F., 2006. Path analysis of the characters influencing essential oil in three *Thymus* species. *Pajuohesh & Sazandegi*, 70:88-94 (In Persian).
 - Mortazavi, M., 2007. Study of genetic variability of lucerne based on morphological, cytogenetic and biochemical markers and evaluation of drought tolerance. M.Sc. thesis, Razi University, Kermanshah, (In Persian).
 - Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S. and Rafalski, A., 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, 2: 225-238.
 - Reddy, M.P., Sarla, N. and Siddiq, E.A., 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and

Study of genetic diversity among 17 populations of alfalfa (*Medicago sativa*) using cytogenetic and ISSR molecular markers

M. Farshadfar^{1*}, M. Rashidi², H. Safari³ and H. Shirvani⁴

1*-Corresponding author, Assoc. Prof., Department of Agriculture, Payame Noor University, Kermanshah, I.R.Iran
Email: farshadfarmohsen@yahoo.com

2-Department of Agriculture, Kermanshah Branch, Islamic Azad University, Kermanshah, I.R.Iran

3-Agriculture and Natural Resources Research Center, Kermanshah, I.R.Iran

4-- M.Sc., Department of Agriculture, Payame Noor University, I.R.Iran

Received: 14.09.2015

Accepted: 20.12.2015

Abstract

Alfalfa (*Medicago sativa* L.) is one of the most important forage crops because of high quality, growing extensively in farms and rangelands of Iran. Genetic variability is one of the most aspects for crop improvement. The experiments were carried out to determine genetic variability among 17 alfalfa populations based on ISSR and cytogenetic markers. All of the tested ISSR primers showed 44 visible bands. Three primers had the most number of bands while another primers showed the least band numbers. Mean percentage of polymorphism in the primers was 90.18 percent. Polymorphic information content (PIC) and marker index (MI) average were 0.36 and 1.88 respectively. Cluster analysis classified the populations genotype into four clusters. In order to investigate karyotypic variation between the populations, the populations were studied for several karyotypic characteristics. Including long arm, short arm and total length of the chromosomes, long arm to short arm and short arm to long arm ratios and total form percentage (TF%). All of the genotypes had 32 chromosomes. Analysis of variance of mitotic data in completely randomized design, showed highly significant differences between the studied genotypes for all of the studied traits ($p < 0.01$). According to the Stebbins classification all of the genotypes located in A₁ class. Cluster analyses grouped the genotypes into four clusters.

Keywords: Alfalfa, cytogenetic, genetic diversity, ISSR molecular markers.