Archive of SID

نشریه تولید گیاهان زراعی
جلد نهم، شماره چهارم، زمستان ۹۵
۷۱-۸٤
http://ejcp.gau.ac.ir

بررسی اکوتیپ‌های یونجه زراعی با استفاده از نشانگرهای ایزوزیمی

وحید نصراله‌زاد اصل[۱]، حسین محمدزاده جلالی[۲*]، مهری یوسفی[۱]، مصطفی ولیزاده[۳] و سجاد محرم‌نژاد[۴]

[۱]مربی گروه علوم کشاورزی، دانشگاه پیام‌نور، تهران، ایران، [۲]باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران، [۳]گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران، [٤]گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۰/۱٦ ؛ تاریخ پذیرش: ۹٤/۱۰/۸

چکیده

سابقه و هدف: یونجه (*Medicago sativa* L.) یکی از مهم‌ترین گیاهان علوفه‌ای در جهان به‌شمار می‌رود که با حدود ۳۲ میلیون هکتار سطح زیر کشت، بیش‌ترین سطح کشت لگوم علوفه‌ای را در سطح جهان دارا است. در واقع تنوع ژنتیکی پیش‌نیاز گزینش در برنامه‌های به‌نژادی برای بهبود صفات، تولید ارقام جدید و سازگار می‌باشد. نشانگرهای آنزیمی نشان‌دهنده این هستند که می‌توان از الگوی وراثت تتراسومیکی برای آنالیز تنوع ژنتیکی استفاده کرد. هدف از این پژوهش تعیین میزان تنوع ژنتیکی و گروه‌بندی جمعیت‌های یونجه مورد مطالعه براساس وجود و عدم وجود نوار آنزیمی است.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش تنوع ژنتیکی ۱۲ خانواده ناتنی یونجه با استفاده از الکتروفورز آنزیمی مورد مطالعه قرار گرفت. تعداد ۳۵ بوته از هر خانواده در گلدان‌های مجزا در ایستگاه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز کشت شدند و مورد تجزیه آنزیمی (روبیسکو، سوپراکسید دیسموتاز، استراز و پراکسیداز) قرار گرفتند.

یافته‌ها: از نظر نشانگرهای آنزیمی، آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و روبیسکو هر کدام یک نوار تک‌شکل در همه خانواده‌ها نشان دادند و آنزیم استراز و پراکسیداز در دو ناحیه واجد نوارهای چندشکل بودند.

* مسئول مکاتبه: hosseinmohammadzadehjalaly@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

داده‌های به‌دست آمده براساس وجود و عدم وجود نوار آنزیمی (۰و۱) در ۱۱ نوار ایزوزیمی چند شکل مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. تفسیر ایزوزیمی بیانگر تنوع بالای درون خانواده‌ها و پایین بودن بین خانواده‌ها بود. میزان متوسط هتروزیگوسی ۰/۲۸۹ برآورد شد. فاصله ژنتیکی نی در تفسیر ایزوزیمی کم و بین ۰/۲٤۸ تا ۰/۳۷۳ بود. تجزیه خوشه‌ای بر اساس ضریب شباهت ژاکارد و به روش UPGMA خانواده‌ها را به دو گروه تقسیم نمود به‌طوری‌که ۱۱ خانواده ناتنی یونجه در یک گروه و تنها خانواده ناتنی چالشته در گروه دیگر قرار گرفت.

نتیجه‌گیری: به‌نظر می‌رسد که در صورت تأیید پایداری نشانگرهای ایزوزیمی مورد مطالعه، از این اطلاعات می‌توان در برنامه‌های اصلاحی و تولید ارقام با میزان زیست‌توده بالا در یونجه استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: بررسی تنوع، خانواده ناتنی، نشانگرهای ایزوزیمی، یونجه

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

یونجه زراعی (*Medicago sativa* L.) بیش از ۳۲ میلیون هکتار از زمین‌های زراعی دنیا را به خود اختصاص داده (۵) و سطح زیر کشت آن در ایران بیش از ٦٨٠ هزار هکتار، برآورد شده است (۲۳). با توجه به این‌که ایران به‌عنوان یکی از مراکز اصلی و اولیه یونجه به‌حساب می‌آید و با در نظر گرفتن سهم حدود ۲ درصدی ایران در کل دنیا از نظر زراعت یونجه که در واقع رتبه بالایی را به خود اختصاص می‌دهد، لازم است علاوه بر حفظ و توسعه سطح زیر کشت یونجه به اصلاح ارقام بومی و سازگار به شرایط آب و هوایی کشور، مبادرت ورزید. منابع ژنتیکی، تأمین‌کننده ژن‌های با ارزشی هستند که در صورت بهره‌برداری صحیح از آن‌ها می‌توان ارقام جدید و مطلوب را تولید کرد. در واقع تنوع ژنتیکی پیش‌نیاز گزینش در برنامه‌های به‌نژادی برای بهبود صفات و تولید ارقام جدید و سازگار می‌باشد (۱ و ۱۷). ارزیابی تنوع ژنتیکی گیاهان زراعی و حفاظت از ذخایر توارثی، کاربرد حیاتی دارد، همچنین اطلاع از میزان تنوع ژنتیکی در گونه‌های مختلف گیاهی برای انتخاب والدین جهت دورگ‌گیری‌های هدفمند و همچنین برای تولید ارقام دورگ مناسب دارای اهمیت می‌باشد (۲۰). جهت کسب اطلاعات مورد نیاز در امر دورگ‌گیری در برنامه‌های به‌نژادی، تعیین میزان اختلاف و یا شباهت‌های افراد از نظر صفات زراعی مهم، امری ضروری و اجتناب‌ناپذیر می‌باشد. تنوع مورفولوژیکی سرآغاز خوبی برای مطالعات مربوط به تنوع ژنتیکی محسوب می‌شود، اما باید توجه داشت که در جمعیت‌های گیاهی و جانوری تعداد صفات مورفولوژیکی برخوردار از تفکیک مندلی ساده، بسیار محدود هستند، از این‌رو استفاده از این صفات، در بررسی جوامع گیاهی با محدودیت‌هایی همراه است، برای رفع این نواقص از نشانگرهای مولکولی استفاده می‌شود که روش مؤثری در برآورد تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها و داخل جمعیت‌ها فراهم ساخته است. برای مثال چند تنوع زیادی در داخل و بین جمعیت‌های یونجه دیپلوئید و تتراپلوئید به کمک نشانگرها مشاهده و مورد استفاده قرار گرفته است که از جمله آن‌ها می‌توان به نشانگرهای پروتئینی (۲۳)، RFLP (۱۰ و ٢٤)، RAPD (۱۲ و ١٤) و SSR (۵، ۹ و ۲۷) اشاره کرد. قابل ذکر است که اغلب نشانگرهای DNA در بیش‌تر بافت‌ها بدون توجه به رشد، تکوین و وضعیت سلول، ثابت هستند و توسط محیط، اثرات پلیوتروپیک و اثرات اپیستازی بر هم زده نمی‌شوند (۲) ولی با توجه به این‌که تنوع تعیین شده توسط نشانگرهای DNA اکثراً تنوع خاموش به حساب می‌آیند، به این منظور برخی از پژوهشگران، هم‌زمان با استفاده از نشانگرهای مبتنی بر DNA، از نشانگرهای آلوزیمی نیز در تجزیه نمونه‌های گیاهی خود استفاده کرده‌اند. چاندرا (۲۰۱۰) تعداد ۱۹۷ فرد از ۵۰ گونه یونجه را از طریق ۱۷ نشانگر SSR و هفت

www.SID.ir

Archive of SID

سیستم آنزیمی مورد مطالعه قرار داد و گزارش کرد که دو گونه *Medicago doliata* و *Medicago scutellata* هم از نظر نشانگرهای SSR و هم از نظر نشانگرهای آنزیمی بیش‌تر از سایر گونه‌ها به هم شباهت دارند (۳). جنزوسفکی و همکاران (۱۹۹۹ الف و ب) تعداد ۳٦ فرد از هر کدام از ۱۵ جمعیت وحشی و ٦ رقم زراعی یونجه را به کمک ۲۵ نشانگر RAPD و پنج مکان ژنی آلوزیمی مورد مطالعه قرار دادند و گزارش کردند که علی‌رغم پایین‌تر بودن تنوع ژنی درون جمعیتی برآورد شده از طریق نشانگر RAPD در مقایسه با نشانگر آلوزیمی، الگوی ساختار جمعیتی برآورد شده از طریق این دو نشانگر با همدیگر مطابقت دارد (۷، ۸ و ۱۱). نتایج مشابهی نیز برای دو نشانگر RAPD و آلوزیم در جمعیت‌های صنوبر گزارش شده است (۲). محمدزاده جلالی و همکاران (۲۰۱۵) در ۱۲ خانواده ناتنی یونجه براساس تفسیر آلوزیمی میزان تنوع ژنتیکی را ۰/۵۷۱ و ارتباط بین وزن تر با برخی از آلوزیم‌های پراکسیداز و استراز مشاهده کردند (۱۳). ولیزاده و همکاران (۲۰۱۱) با بررسی تنوع ژنتیکی نسل‌های سنتتیک یونجه و برخی ارقام یونجه با استفاده از وراثت تتراسومیک نشانگرهای آلوزیمی بیان نمودند که هتروزیگوتی بالای در داخل جمعیت‌های یونجه وجود دارد. طوری‌که تنوع بسیار بالای درون- جمعیتی، یونجه سنتتیک نتوانست تمایز واریته‌ای چشمگیری تولید کند (۲۳). هدف از این پژوهش تعیین میزان تنوع ژنتیکی و گروه‌بندی جمعیت‌های یونجه مورد مطالعه براساس وجود و عدم وجود نوار آنزیمی است.

مواد و روش‌ها

دوازده خانواده‌های ناتنی از خزانه پلی‌کراس حاصل از یک برنامه ملی تحقیقات برای اصلاح و معرفی مناسب‌ترین ارقام یونجه در منطقه آذربایجان (۲۲)، در این پژوهش مورد ارزیابی قرار گرفتند (جدول ۱). از هر خانواده ۳۵ بوته در داخل گلدان‌هایی با ابعاد ۲۵×۲۰×۱۵ سانتی‌متر کاشته و برای تجزیه آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت. تجزیه‌های آنزیمی روی برگ‌های جوان و انتهایی ساقه اصلی بوته بالغ انجام شد. برای استخراج آنزیم‌ها از روش ولیزاده و همکاران (۲۰۱۱) استفاده شد و به‌منظور حفظ بهتر مولکول‌های آنزیم، ۲- مرکاپتواتانول به‌صورت تازه و با نسبت ۰/۱ درصد به بافر استخراج افزوده شد (۲۳). برای انجام الکتروفورز از ژل آکریلامید (غلظت ۷ درصد) استفاده شد، به‌طوری‌که ژل آکریلامید یک روز قبل از الکتروفورز نمونه‌ها و در یخچال و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد و در داخل بافر الکترود نگهداری شد. جهت انجام الکتروفورز، ژل از یخچال خارج و روی شیشه مخصوص قرار داده شد و به‌وسیله شانه فلزی مخصوص، چاهک‌ها در دو سانتی‌متری ابتدای ژل ایجاد

www.SID.ir

Archive of SID

و محل چاهک‌ها با محلول یک درصد آبی‌بروموفنول نشانه گذاری شدند. سپس عصاره آنزیمی به‌وسیله قطعات بریده شده کاغذ واتمن شماره ٣ و مناسب با ابعاد چاهک، آغشته شده و کاغذهای مذکور با استفاده از پنس در چاهک‌های ژل بارگذاری و در نهایت ژل روی تانک الکتروفورز افقی قرار گرفت و به‌منظور جلوگیری از واسرشته شدن آنزیم‌ها، الکتروفورز تحت شرایط دمای پایین، به‌مدت ٤ ساعت و با شدت جریان ثابت ٣٠ میلی‌آمپر انجام شد.

جدول ١- اسامی و منشاء خانواده‌های ناتنی مورد مطالعه.

Table 1. List of alfalfa half-sib families analyzed in this study.

شماره No.	خانواده‌های ناتنی Half-sib families	منطقه Locality	کشور Country
1	لیلان حمید Leylan-hamid	اراک Arak	ایران Iran
2	گله بانی Galebani	مرند Marand	ایران Iran
3	قره یونجه Ghara-yonje	مراغه Maraghe	ایران Iran
4	مامان فامنین Maman-famenin	همدان Hamedan	ایران Iran
5	عموزین الدین Amo-zeynetdin	تبریز Tabriz	ایران Iran
6	تازه کند Taze-kand	نقده Nagadeh	ایران Iran
7	زغال آغاج Zoghal-aghaj	تبریز Tabriz	ایران Iran
8	سلوانا Selvana	ارومیه Urmia	ایران Iran
9	شازند Shazand	اراک Arak	ایران Iran
10	مائوپا Maopa	-	امریکا USA
11	رنجر Ranger	-	امریکا USA
12	چالشته Chaleshte	چهارمحال بختیاری Chahar Mahale Bakhtiyary	ایران Iran

www.SID.ir

Archive of SID

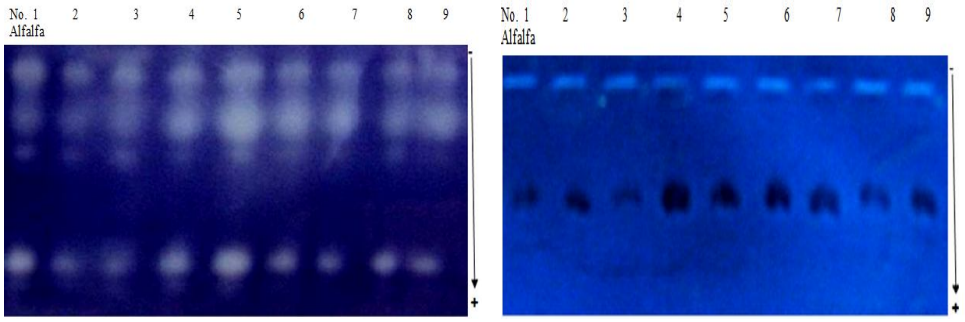
بعد از پایان الکتروفورز برای رنگ‌آمیزی آنزیم پراکسیداز از روش اولسون و وارنر (۱۹۹۳) و آنزیم‌های روبیسکو، سوپراکسید دیسموتاز و استراز از دستورالعمل موجود در سولتیس و سولتیس (۱۹۹۰) با اندکی تغییر استفاده شد. لازم به توضیح است که شدت نوارها در آزمایش‌های مکرر به‌ویژه در آنزیم استراز فقط زمانی قابل‌قبول بود که استخراج آنزیم از برگ‌های یونجه در همان روز انجام گرفته شد (۱۸ و ۲۱). بعد از اتمام رنگ‌آمیزی و ظهور نوارهای ایزوزیمی روی ژل و عکس‌برداری یا یادداشت‌برداری از آن‌ها، نشانگرهای ایزوزیمی به‌صورت کیفی ارزیابی شدند. در این ارزیابی به حضور یا عدم حضور هر نوار آنریمی در یک جایگاه خاص به‌ترتیب امتیاز یک و صفر در نظر گرفته شد و میانگین هتروزیگوتی مورد انتظار با فرض تعادل (He) از طریق فرمول $H_e = 1 - \sum p_i^2$ برآورد شد که در آن Pi فراوانی الل i در یک مکان ژنی در یک جمعیت است. شاخص تنوع ژنتیکی نی از فرمول $H_s = \frac{1}{k}.\sum_{s=1}^{k} H_{Ss} = \frac{1}{k}.\sum_{s=1}^{k}\left[1 - q_s^2 - (1-q_s)^2\right]$ برآورد شد (نی، ۱۹۷۳) که در آن k تعداد مکان‌های ژنی و q_s فراوانی آلل مشهود است، همچنین شاخص تنوع ژنتیکی شانون از فرمول $H = -\sum_{i=1}^{s} p_i \ln(p_i)$ برآورد شد که در آن H شاخص شانون، p_i فراوانی الل جمعیتiام، S تعداد الل‌ها و e = ۲/۷۱۸۲۸۱۸۲۸ در نظر گرفته شد (٤ و ١٦). برای رسم کلاستر نتایج به‌دست آمده از الگوی نواری ایزوزیمی از نرم‌افزار POPGENE 3.2 استفاده شد.

نتایج و بحث

با توجه به روش الکتروفورز اکریلامید افقی و سیستم بافری به‌کار رفته، برای چهار آنزیم (٦) مورد بررسی در خانواده‌های ناتنی یونجه مطالعه شده، تعداد ۱۱ ایزوزیم چندشکل تشخیص داده شد که بر اساس وجود و عدم وجود نوار آنزیمی (۱و۰)، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. آنزیم‌های روبیسکو و سوپراکسید دیسموتاز نوارهای تک‌شکل نشان دادند (شکل ۱) و دو آنزیم استراز و پراکسیداز آشکارا نوارهای چندشکل نشان دادند، شکل (۲) نام‌گذاری ایزوزیم‌های چندشکل را نشان می‌دهد.

www.SID.ir

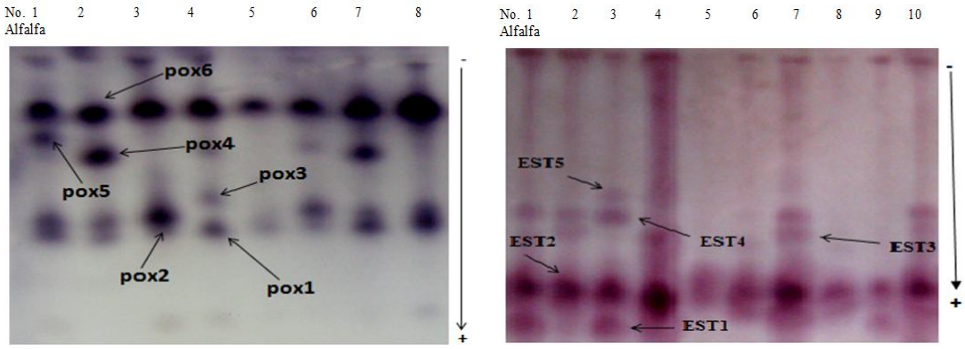
Archive of SID



شکل ١- ایزوزیم‌های تک‌شکل روبیسکو (سمت راست) و سوپراکسید دیسموتاز (سمت چپ) در خانواده‌های ناتنی یونجه.

Figure 1. Monomorphic of rubisco (right) and superoxide dismutase (left) in alfalfa half-sib families.

با توجه به فراوانی ایزوزیم‌ها (جدول ٢) ملاحظه می‌شود که تنها خانواده ناتنی شازند برای همه ١١ نشانگر ایزوزیمی مورد مطالعه دارای چندشکلی نشان داده است، در حالی‌که سایر خانواده‌های ناتنی اکثراً در ٩ نشانگر ایزوزیمی چندشکلی داشتند. با توجه به این جدول، میانگین فراوانی‌های ایزوزیم‌های EST-2 و POX-6 بیش‌ترین دامنه تغییرات را داشتند. در مقابل ایزوزیم‌های EST-5 و POX-4 حالت بینابینی را در اکثر خانواده‌های ناتنی نشان دادند که از نظر کاربرد روش‌های اصلاحی دارای اهمیت بیش‌تری (به‌دلیل حداکثر بودن هتروزیگوسیتی) نسبت به سایر ایزوزیم‌های مورد بررسی دارد.



شکل ٢- ایزوزیم‌های چندشکل استراز (سمت راست) و پراکسیداز (سمت چپ) در خانواده‌های ناتنی یونجه.

Figure 2. Polymorphic of esterase (right) and peroxidase (left) in alfalfa half-sib families

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج هتروزیگوسی مورد انتظار(H_e) از طریق ضریب نی برای هر نشانگر ایزوزیمی با لحاظ کردن حضور به‌عنوان یک الل و عدم حضور به‌عنوان الل دیگر در هر خانواده در جدول (۳) درج شده است. نتایج نشان داد که خانواده ناتنی چالشته شاخص‌های تنوع ژنتیکی بالاتری از لحاظ شاخص تنوع ژنتیکی نی (۰/۳۷۳±۰/۰۱٤) و شاخص تنوع شانون (۰/۵۷۲±۰/۰۹۲) نسبت به خانواده‌های دیگر داشت. همچنین کم‌ترین میزان تنوع ژنتیکی از لحاظ تنوع ژنتیکی نی (۰/۲٤۸±۰/۰۱٦) و شاخص تنوع شانون (۰/٤۳۰±۰/۰۱۲) مربوط به خانواده ناتنی سلوانا بود. به‌طور متوسط میانگین شاخص تنوع ژنتیکی نی (۰/۲۹۸±۰/۰۳۷) و شاخص تنوع شانون (۰/٤۸۸±۰/۰٤۱) در کل خانواده‌های ناتنی به‌دست آمد. منگونی و همکاران (۲۰۰۰) جمعیت‌های یونجه را به‌وسیله نشانگر RAPD بررسی کردند و کم‌ترین He را برابر ۰/۲۸۳ و بیش‌ترین مقدار آن را برابر ۰/٤۱۲ گزارش کردند (۱۲). رضایی و همکاران (۲۰۱۰) تنوع ژنتیکی را در اکوتیپ‌های یونجه زراعی در نواحی مرکزی و شرقی ایران با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره بررسی و گزارش کردند تنوع ژنتیکی نی بین ۰/۲۹ تا ۰/۳ و شاخص شانون از ۰/٤۵ تا ۰/٤٦ برآورد شدند. همچنین تعداد الل مؤثر را نیز ۱/٤۹ گزارش شد (۱۹) که این نتایج با نتایج پژوهش تقریباً هم‌خوانی دارد.

فاصله ژنتیکی بین خانواده‌ها از طریق فرمول نی در جدول (٤) درج شده است. با توجه به میانگین فاصله ژنتیکی، خانواده ناتنی چالشته بیش‌ترین فاصله (۰/۰٤۸۵) را از سایر خانواده‌های ناتنی نشان داد. کم‌ترین فاصله متعلق به خانواده‌های ناتنی قره‌یونجه و مائوپا (۰/۰۰۷) بود و بیش‌ترین فاصله به خانواده‌های ناتنی سلوانا و چالشته (حدود ۰/۰۸۹) تعلق داشت. به‌عبارت دیگر با توجه به نتایج به‌دست آمده، خانواده‌های ناتنی یونجه مورد مطالعه از هم حدود ۹ درصد فاصله و ۹۱ درصد مشابهت داشتند. در کل می‌توان فاصله ژنتیکی بسیار پایین بین ارقام و جمعیت‌های یونجه را به ساختار ژنتیکی بسیار هتروزیگوت و وراثت تتراسومیک یونجه نسبت داد که باعث افزایش تنوع درون جمعیت می‌شود که این امر باعث تحت‌تأثیر قرار دادن تنوع بین جمعیتی می‌گردد. وندرمارک و همکاران (۲۰۰٦) در بررسی جمعیت‌های ژرم پلاسم یونجه به‌وسیله نشانگرهای SRAP مقدار شباهت ژنتیکی بین ارقام و ژرم پلاسم‌های یونجه را با استفاده از ضریب فاصله ژنتیکی نی محاسبه کردند (۲۵). بیش‌ترین فاصله بین دو جمعیت ۰/۵۰ و کم‌ترین فاصله برابر ۰/۱۱ گزارش شد. با وجود این تجزیه داده‌های وندرمارک و همکاران (۲۰۰٦) در حالت بالک ضرایب فاصله را کاهش داد و به ۰/۰٤ در کم‌ترین حالت رساند (۲۵) که این مقدار با برآورد مطالعه حاضر مطابقت بیش‌تری دارد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- فراوانی ایزوزیم‌ها در خانواده‌های ناتنی یونجه.

Table 2. Isozymes frequency in alfalfa half-sib families.

ایزوزیم‌ها Isozymes		لیلان حمید Leylan-hamid	گله بانی Galebani	قره یونجه Ghara-yonje	مامان فامنین Maman-famenin	عمو زین‌الدین Amo-zeynetdin	تازه‌کند Taze-kand	زغال‌اغاج Zoghal-aghaj	سلوانا Selvana	شاراند Shazand	ماتوپا Maopa	رنجر Ranger	چالشته Chaleshte	میانگین Mean
EST-1	0	0.78	0.72	0.83	0.77	0.68	0.75	0.69	0.91	0.54	0.81	0.73	0.71	0.75
	1	0.22	0.28	0.17	0.23	0.32	0.25	0.31	0.09	0.46	0.19	0.27	0.29	0.25
EST-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.05	0	0	0	0.01
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.95	1	1	1	0.99
EST-3	0	0.29	0.44	0.53	0.45	0.37	0.40	0.18	0.41	0.32	0.67	0.27	0.29	0.38
	1	0.71	0.56	0.47	0.55	0.63	0.60	0.82	0.59	0.68	0.33	0.73	0.71	0.62
EST-4	0	0.36	0.13	0.10	0.09	0.16	0.35	0.13	0.14	0.09	0.05	0.07	0.19	0.15
	1	0.64	0.87	0.90	0.91	0.84	0.65	0.87	0.86	0.91	0.95	0.93	0.81	0.85
EST-5	0	0.64	0.70	0.42	0.50	0.58	0.40	0.43	0.27	0.41	0.43	0.73	0.67	0.52
	1	0.36	0.30	0.58	0.50	0.42	0.60	0.57	0.73	0.59	0.57	0.27	0.33	0.48
POX-1	0	0.09	0.24	0.16	0.40	0.24	0.14	0.24	0.08	0.25	0.05	0.29	0.16	0.20
	1	0.91	0.76	0.84	0.60	0.76	0.86	0.76	0.92	0.75	0.95	0.71	0.84	0.80
POX-2	0	0.48	0.20	0.32	0.24	0.19	0.10	0.28	0.25	0.29	0.36	0.24	0.40	0.28
	1	0.52	0.80	0.68	0.76	0.81	0.90	0.72	0.75	0.71	0.64	0.76	0.60	0.72
POX-3	0	0.52	0.56	0.76	0.80	0.86	0.90	0.88	0.79	0.75	0.77	0.82	0.64	0.76
	1	0.48	0.44	0.24	0.20	0.14	0.10	0.12	0.21	0.25	0.23	0.18	0.36	0.24
POX-4	0	0.43	0.36	0.40	0.52	0.43	0.25	0.64	0.67	0.74	0.50	0.41	0.28	0.47
	1	0.56	0.64	0.60	0.48	0.57	0.75	0.36	0.33	0.26	0.50	0.59	0.72	0.53
POX-5	0	0.87	0.68	0.84	0.92	0.81	0.85	0.92	0.92	0.87	0.91	1	0.64	0.85
	1	0.13	0.32	0.16	0.08	0.19	0.15	0.08	0.08	0.13	0.09	0	0.36	0.15
POX-6	0	0	0	0.04	0	0	0	0	0	0.08	0	0	0.36	0.04
	1	1	1	0.96	1	1	1	1	1	0.92	1	1	0.64	0.96

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳- میانگین شاخص‌های تنوع ژنتیکی همه خانواده‌های ناتنی یونجه از نظر تمام ایزوزیم‌ها.

Table 3. Mean of genetic diversity indexes in alfalfa half-sib families from all isozymes.

خانواده‌های ناتنی Half-sib families	تعداد نمونه Samples	شاخص نی Nei's index	شاخص شانون Shanon index
لیلان حمید Leylan-hamid	25	0.321±0.019	0.522±0.012
گله بانی Galebani	24	0.328±0.017	0.536±0.011
قره یونجه Ghara-yonje	22	0.304±0.016	0.483±0.011
مامان فامنین Maman-famenin	23	0.302±0.019	0.496±0.012
عمو زین‌الدین Amo-zeynetdin	20	0.305±0.017	0.507±0.011
تازه کند Taze-kand	20	0.273±0.017	0.464±0.012
زغال آغاج Zoghal-aghaj	24	0.275±0.017	0.466±0.012
سلوانا Selvana	23	0.248±0.016	0.430±0.012
شازند Shazand	23	0.326±0.014	0.496±0.010
مائوپا Maopa	21	0.263±0.019	0.439±0.013
رنجر Ranger	16	0.258±0.018	0.452±0.013
چالشته Chaleshte	23	0.373±0.014	0.572±0.092
میانگین Mean	22	0.298±0.037	0.488±0.041

www.SID.ir

جدول ٤- فاصله ژنتیکی نی داده‌های ایزوزیمی در خانواده‌های ناتنی یونجه.

Table 4. Nei's genetics distance among of alfalfa half-sib families.

خانواده‌های ناتنی Half-sib families	لیلان حمید Leylan-hamid	گله بانی Galebani	قره یونجه Ghara-yonje	مامان فامنین Maman-famenin	عمو زین‌الدین Amo-zeynetdin	تازه کند Taze-kand	زغال آغاج Zoghal-aghaj	سلوانا Selvana	شازند Shazand	مائوپا Maopa	رنجر Ranger	میانگین Mean
گله بانی Galebani	0.029											0.034
قره یونجه Ghara-yonje	0.040	0.028										0.025
مامان فامنین Maman-famenin	0.050	0.029	0.014									0.025
عمو زین‌الدین Amo-zeynetdin	0.038	0.018	0.016	0.010								0.043
تازه کند Taze-kand	0.058	0.043	0.021	0.033	0.018							0.038
زغال آغاج Zoghal-aghaj	0.050	0.055	0.034	0.019	0.018	0.044						0.033
سلوانا Selvana	0.063	0.069	0.021	0.026	0.036	0.045	0.019					0.039
شازند Shazand	0.059	0.059	0.041	0.025	0.029	0.067	0.010	0.026				0.040
مائوپا Maopa	0.058	0.045	0.007	0.025	0.032	0.043	0.052	0.024	0.047			0.038
رنجر Ranger	0.038	0.025	0.035	0.019	0.009	0.041	0.027	0.062	0.046	0.056		0.033
چالشته Chaleshte	0.030	0.025	0.043	0.056	0.034	0.055	0.065	0.089	0.075	0.071	0.039	0.049

Archive of SID

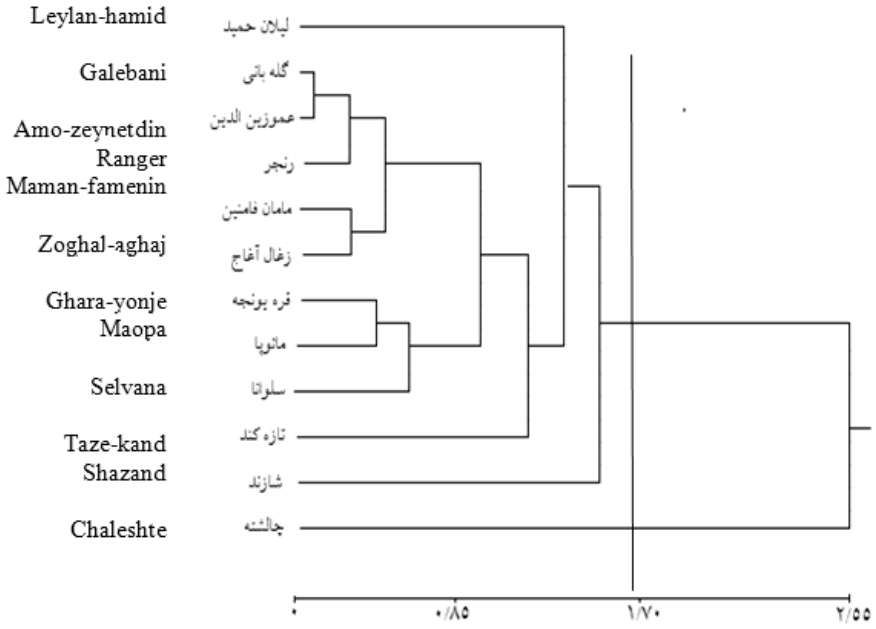
www.SID.ir

Archive of SID

تجزیه خوشه‌ای و محل برش در دندروگرام براساس تجزیه تابع تشخیص، از طریق داده‌های آنزیمی در شکل (۳) نشان داده شده است. همان‌طور که دیده می‌شود تفاوت قابل‌توجهی از نظر تمایز بین خانواده‌های ناتنی دیده نشد. تنها خانواده ناتنی چالشته فاصله بیش‌تری با سایر خانواده‌های ناتنی داشت و در گروه متفاوتی با سایر خانواده‌های ناتنی قرار گرفت. که این گروه‌بندی با توجه به نتایج قبلی (ضریب فاصله نی و شاخص تنوع) دور از انتظار نیست.

نتیجه‌گیری کلی

این نتایج نشان می‌دهد که تنوع ژنتیکی بر اساس نشانگرهای ایزوزیمی در بین ۱۲ خانواده ناتنی یونجه مورد مطالعه وجود دارد. طوری‌که می‌توان از تنوع ژنتیکی موجود در برنامه‌های اصلاحی استفاده کرد (۱، ۱۵ و ۲۶).



شکل ۳- تجزیه خوشه‌ای خانواده‌های ناتنی یونجه به‌وسیله روش UPGMA از طریق داده‌های آنزیمی.

Figure 3. Cluster analysis of alfalfa half-sib families based on enzyme data by UPGMA method.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

1.Abbasi, M.R. 2015. Evaluation of Iranian wild *Medicago* genetic resources in order to use in agronomic systems. Electronic J. Crop Prod., 8 (2): 225-238. (In Persian)

2.Agarwal, M., Shrivastava, N., and Padh, H. 2008. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. Plant Cell Rep., 27: 617-631.

3.Chandra, A. 2010. Studies on morphological and genetical similarities of *M. murex* and *M. doliata* to *M. scutellata*. J. Environ. Biol., 31: 803-808.

4.Clegg, M.T. 1997. Plant genetic diversity and the struggle to measure selection. J. Heredity, 88: 1-7.

5.Flajoulot, S., Ronfort, J., Baudouin, P., Barre, P., Huguet, T., Huyghe, C., and Julier, B. 2005. Genetic diversity among alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivars coming from a breeding program, using SSR markers. Theor. Appl. Genet., 111: 1420-1429.

6.Gomez, A., 1998. Allozyme electrophoresis: its application to rotifers. Hydrobiologia, 388: 385-393.

7.Jenczewski, E., Prosperi, J.M., and Ronfort, J. 1999a. Evidence for gene flow between wild and cultivated *Medicago sativa* based on allozyme markers and quantitative traits. Bot., 86: 677-687.

8.Jenczewski, E., Prosperi, J.M., and Ronfort, J. 1999b. Differentiation between natural and cultivated populations of *Medicago sativa* from Spain: Analysis with random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and comparison to allozymes. Mol. Ecol., 8: 1317-1330.

9.Herrmann, D., Flajoulot, S., and Julier, B. 2010. Sample size for diversity studies in tetraploid alfalfa (*Medicago sativa*) based on co-dominantly coded SSR markers. Euphytica, 171: 441-44.

10.Lakzian, A., Karimi, E., Khavazi, K., and Haghni, G. 2008. Genetic diversity of *Sinorhizobium meliloti* isolated from root nodules of alfalfa (*Medicago sativa*) growing in Hamadan soils (Iran) using plasmid profile and PCR/RFLP. Int. J. Agri. Biol., 10: 669-672.

11.Malaviya, D.R., Kumar, B., Roy, A.K., Kaushal, P., and Tiwari, A. 2005. Estimation of variability of five enzyme systems among wild and cultivated species of *Trifolium*. Gen. Res. Crop Evo., 52: 967-976.

12.Mengoni, A., Gori, A., and Bazzicallpo, M. 2000. Use of RAPD and of tetraploid microsatellite (SSR) variation to assess genetic relationships among population of tetraploid alfalfa. Plant Breed., 119: 311-317.

13.Mohammadzadeh Jalaly, H., Valizadeh, M., Ahmadi, M., Nabizadeh, H., Moharramnejad, S., and Moghaddam, M. 2015. Discrimination of alfalfa half-sib families by allozyme banding pattern and its relationship with forage yield attributes. J. Bio. Env. Sci., 6: 344-350.

www.SID.ir

Archive of SID

14. Nagl, N., Taski-Ajdukovic, K., Barac, G., Baburski, A., Seccareccia, I., Milic, D., and Katic, S. 2011. Estimation of the genetic diversity in tetraploid alfalfa populations based on RAPD markers for breeding purposes. Int. J. Mol. Sci., 12: 5449-5460.
15. Nassar, J., Hamrick, J.L., and Fleming, T.H. 2002. Allozyme diversity and genetic structure of the leafy cactus (*Pereskia guamacho*). Genetic, 93: 193-200.
16. Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proc. Nat. Acad. Sci., 70: 3321-3323.
17. Oleson, B.T. 1996. World wheat production, utilization and trade. In: Bushuk, W. and Rasper, V.F. (eds). Wheat Production, Properties and Quality. Chapman and Hall, Pp: 1-11.
18. Olson, P.D., and Varner, J.E. 1993. Hydrogen peroxides and lignifications. Plant J., 4: 887-892.
19. Rezaie, M., Naghavi, M.R., and Maali-Amiri, R. 2010. Assessment of genetic diversity in alfalfa (*Medicago sativa* L.) ecotypes from central and eastern regions of Iran using SSR markers. Iran. J. Crop Sci., 12: 520-532. (In Persian)
20. Singh, S.K. 2003. Cluster analysis for heterosis in wheat (*Triticum aestivum* L.). Ind. J. Genet., 63: 249-250.
21. Soltis, D.E., and Soltis, P.S. 1990. Isozymes in Plant Biology. Chapman and Hall, London, Pp: 259-261.
22. Valizadeh, M., Moghaddam, M., Talebi, P., Kazemi, M.H., Monirifar, H., and Hassanpanah, D. 2002. Breeding and Introduction of suitable alfalfa cultivars in East-Azarbaijan. University of Tabriz Research Affairs Pub., Tabriz, Iran, 120p.
23. Valizadeh, M., Mohayeji, M., Yasinzadeh, N., Nasrullazadeh, S., and Moghaddam, M. 2011. Genetic diversity of synthetic alfalfa generations and cultivars using tetrasomic inherited allozyme markers. J. Agr. Sci. Technol., 13: 425-430.
24. Valizadeh, M., Kang, K.K., Kanno, A., and Kameya, T. 1996. Analysis of genetic distance among nine *Medicago* species by using DNA polymorphism. Breeding Sci., 46: 7-10.
25. Vandemark, G.J., Ariss, J.J., Bauchan, G.A., Larsen, R.C., and Hughes, T.J. 2006. Estimating genetic relationships among historical sources of alfalfa germplasm and selected cultivars with sequence related amplified polymorphisms. Euphytica, 152: 9-16.
26. Volis, S., Mendlinger, S., Turuspekovk, Y., Esnazarov, U., Abugaliva, S., and Orlovesky, N. 2001. Allozyme variation in turkmenian populations of wild barly, Hordeum spontaneum Koch. Ann. Bot., 87: 435-446.
27. Zhi-Peng, L., Gong-She, L., and Yang, Q.C. 2007. A novel statistical method assessing SSR variation in autotetraploid alfalfa (*Medicago sativa* L.). Genet. Mol. Biol., 30: 385-391.

www.SID.ir