دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۳، شماره ۲، صفحه ۱۶۳-۱۵۱ (۱۳۹۴)

بهره‌گیری از نشانگرهای ریزماهواره یونجه در ارزیابی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های اسپرس زراعی

سیاره ایرانی[۱]، آقافخر میرلوحی[۲]، محمد مهدی مجیدی*[۳] و مجید طالبی[۴]

۱ – دانشجوی دکتری، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

۲ – استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

۳*– نویسنده مسئول مکاتبات، دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان پست الکترونیک: majidi@cc.iut.ac.ir

۴ – استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۱/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۴/۲۲

چکیده

در این مطالعه به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی ۲۲ جمعیت اسپرس زراعی جمع‌آوری شده از مناطق جغرافیایی مختلف از نشانگرهای ریزماهواره جنس *Medicago* استفاده شد. محتوی اطلاعات چند شکل برای جایگاه‌های ریزماهواره‌ای مورد مطالعه در فاصله ۰/۲۰ تا ۰/۴۳ متغیر بود و میانگینی برابر ۰/۳۳ داشت. نشانگرهای mtgsp_005e04.taa.9 و Aac004 با داشتن بیشترین محتوی چندشکلی به‌عنوان نشانگرهای مفید جهت مطالعات ژنتیکی شناخته شدند. بر اساس تجزیه خوشه‌ای، جمعیت‌های اسپرس زراعی در دو گروه اصلی (ایرانی و خارجی) و هر کدام در دو زیر گروه طبقه‌بندی شدند. جمعیت‌های اسپرس زراعی خارجی براساس محل جمع‌آوری به دو زیر گروه اروپای غربی و اروپای مرکزی-شرقی تقسیم‌بندی شدند. نتایج تجزیه خوشه‌ای با استفاده از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی متعادل نیز مورد تایید قرار گرفت. بر اساس تجزیه واریانس مولکولی ، میزان ۱۳/۶ درصد از کل تنوع به تفاوت بین جمعیت‌های اسپرس زراعی ایرانی و خارجی و ۶۹/۵ درصد به تفاوت درون جمعیت‌ها اختصاص داشت. در تجزیه واریانس مولکولی، مقدار شاخص تثبیت برابر با ۰/۲۷ حاصل شد که نشان‌دهنده تفکیک و تمایز بالا بین جمعیت‌های اسپرس زراعی و خارجی است. در مجموع، آغازگرهای SSR مورد استفاده در این آزمایش، چندشکلی بالایی را نشان دادند و تنوع ژنتیکی موجود در ژرم‌پلاسم اسپرس مورد مطالعه را با کارایی بالایی به تصویر کشیدند.

واژه‌های کلیدی: انتقال‌پذیری، محتوی اطلاعات چندشکل، تجزیه به مؤلفه‌های اصلی متعادل، تجزیه خوشه‌ای.

مقدمه

اسپرس با نام علمی *Onobrychis viciifolia* scop. متعلق به خانواده بقولات می‌باشد (Carbonero *et al.*, 2011). جنس *Onobrychis* بر اساس خصوصیات بذری به ۱۷۰ گونه تقسیم شده است. مقاومت به خشکی بارزترین ویژگی است که این گیاه را برای کشت در دیم‌زارها و مراتع مطلوب ساخته است (Hume *et al.*, 1985). در برگ اسپرس مقدار زیادی تانین وجود دارد که از نفخ و هیدرولیز پروتئین در شکمبه دام جلوگیری و باعث افزایش جذب اسید آمینه‌ها در روده کوچک نشخوارکنندگان می‌شود (Carbonero *et al.*, 2011).

آگاهی از میزان تنوع ژنتیکی ذخایر توارثی گونه‌های گیاهی مختلف در ایجاد ارقام ساختگی که متداول‌ترین روش اصلاحی در بقولات علوفه‌ای می‌باشد، از اهمیت خاصی برخوردار است. بطوری‌که تولید ارقام ساختگی مبتنی بر انتخاب والدین متنوع و با عملکرد مطلوب مورد نظر است تا در نتیجه آن، حداکثر هتروزیس در نتاج حاصل گردد. همچنین، اطلاع از میزان چندشکلی یا تفاوت بین نمونه‌های مختلف به‌منظور کاهش حجم نمونه‌های ذخایر توارثی نگهداری شده در بانک ژن و بررسی خلوص بذر در گیاهان دگرگشن حائز اهمیت است (Brummer, 1999). مطالعه تنوع ژنتیکی از طریق نشانگرهای مورفولوژیک با محدودیت‌هایی از جمله چندشکلی پایین، وراثت‌پذیری کم و تاثیرپذیری از شرایط محیطی همراه است (Werlemark *et al*., 1999). نشانگرهای مولکولی تنوع ژنتیکی را در سطح DNA آشکار می‌کنند و مشکلات ذکر شده در رابطه با نشگرهای مورفولوژیک را ندارند. همچنین، نشانگرهای مولکولی ابزارهای قوی در ارزیابی روابط خویشاوندی، انتخاب گیاهان برتر و بررسی شباهت یا تفاوت میان نمونه‌های مختلف می‌باشند (Awasthi *et al*., 2004).

در این میان، میکروساتلیت‌ها یا توالی‌های تکراری ساده (SSR) تکرارهای ۶-۱ جفت بازی از توالی DNA هستند که در ابتدا گمان می‌شد که فقط در نواحی غیر کدکننده توالی DNA وجود دارند. در حالی که با گذشت زمان وقوع میکروساتلیت‌ها در توالی‌های کدکننده یا ترجمه شده مشخص شد و EST-SSR ها گسترش یافتند (Choudhary *et al*., 2009). نشانگرهای ریزماهواره عموماً سطوح بالاتری از چند شکلی را نشان می‌دهند و با توجه به فراوانی تعداد آلل در هر مکان ژنی حتی قادر به تمایز بین گونه‌های بسیار مشابه نیز هستند (Kuleung *et al*., 2004; Kalia *et al*., 2011). گسترش آغازگرهای SSR از کتابخانه‌های ژنومی روشی گران، پر زحمت و نیازمند به مهارت می‌باشد. با دسترسی به‌تعداد بسیاری از ESTها و دیگر اطلاعات توالی DNA، گسترش آغازگرهای SSR از طریق استخراج اطلاعات بخشی کارآمد و کم‌هزینه برای بسیاری از گونه‌های گیاهی شده است (Eujayl *et al*., 2004; Varshney *et al*., 2005). اگرچه در سال‌های اخیر، تعداد زیادی از پایگاه‌های اطلاعاتی EST برای موجودات مدل و غیر مدل در دسترس قرار گرفته‌اند و تکنولوژی‌های نسل جدید توالی‌یابی در زمینه تحقیقات ژنتیک تحولات عظیمی ایجاد کرده است، اما سهم گیاهی مثل اسپرس در این پایگاه‌ها نسبتاً اندک است. بنابراین، یک روش ساده برای توسعه آغازگر SSR در گونه‌های کمتر مورد مطالعه، استفاده از آغازگرهای SSR گونه‌های مرتبط می‌باشد. ژنومیکس مقایسه‌ای آشکار کرده است که ترتیب و محتوی ژن در میان گونه‌های مرتبط نزدیک بسیار حفاظت شده است. همراستایی از نشانگرهای به تصویر کشیده شده توسط نقشه‌های مقایسه‌ای نشان می‌دهد که یک آغازگر از یک جنس یا گونه می‌تواند در جنس یا گونه دیگر موجود باشد (Kuleung *et al*., 2004). بنابراین، کاربرد آغازگرهایی بر اساس اطلاعات توالی یک گونه می‌تواند برای آشکارکردن آغازگرهای SSR در گونه‌های مرتبط مورد استفاده قرار گیرد. این کاربرد انتقال‌پذیری نامیده می‌شود که به‌طور موفق در بسیاری از گونه‌ها انجام شده است (Eujayl *et al*., 2004; Kuleung *et al*., 2004; Saha *et al*., 2004; Chu *et al*., 2011; Kalia *et al*., 2011).

توسط Demdoum و همکاران (۲۰۱۱) تعداد ۲۷ آغازگر SSR از *Medicago sativa* و *Glycin max* برای انتقال پذیری در گونه *O. vicifolia* آزمون شد و پس از شناسایی آغازگرهایی با قدرت ایجاد چندشکلی ، از ۶ جفت آغازگر SSR برای انگشت‌نگاری و تخمین تشابه ژنتیکی در ۲۳ توده اسپرس زراعی و دو گونه وحشی استفاده شد. بر این اساس، توده‌های اسپرس زراعی از دو گونه وحشی اسپرس و ۲۳ توده اسپرس زراعی بر اساس منشأ جغرافیایی تفکیک شدند (Demdoum *et al*., 2011). در مطالعه دیگری توسط Avci و همکاران (۲۰۱۴) انتقال‌پذیری ۹۵ آغازگر SSR از *Medicago truncatula* و *Paseolus sativa* به اسپرس را مورد ارزیابی قرار دادند و ۱۸ نشانگر به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی در جنس اسپرس

شناسایی شد. بر اساس تجزیه خوشه‌ای، ۵۸ نمونه از جنس اسپرس به دو گروه اصلی گروه‌بندی شدند. گروه اول شامل نمونه‌هایی از بخش Hymenobrychis و Heliobrychis و گروه دوم شامل نمونه‌هایی از بخش Onobrychis، Lapobrychis و Dendorychis بود. با توجه به تعداد کم آغازگرهای ریزماهواره شناخته شده در اسپرس، این مطالعه به‌منظور شناسایی آغازگرهای ریزماهواره در اسپرس و تعیین سطح تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مختلف اسپرس زراعی ایرانی و خارجی صورت گرفت.

جدول ۱- مشخصات محل جمع‌آوری جمعیت‌های اسپرس زراعی مورد مطالعه در بررسی تنوع ژنتیکی با نشانگر ریزماهواره

شماره	کد	کشور	عرض جغرافیایی	طول جغرافیایی	ارتفاع
۱	VICUNS۸	ایران	۵۳/۰۰	۳۲/۰۰	۱۲۰۰
۲	VICESfS۹	ایران	۵۳/۰۰	۳۲/۰۰	۱۲۰۰
۳	VICUNS۱۸	ایران	۵۳/۰۰	۳۲/۰۰	۱۲۰۰
۴	VICUNS۳۹	ایران	۵۳/۰۰	۳۲/۰۰	۱۲۰۰
۵	VICUNS۴۲	ایران	۵۳/۰۰	۳۲/۰۰	۱۲۰۰
۶	VICRUS۱۱۲	روسیه	۵۵/۷۵	۳۷/۶۱	۱۴۴/۱۷
۷	VICRUS۱۱۳	روسیه	۵۵/۷۵	۳۷/۶۱	۱۴۴/۱۷
۸	VICRUS۱۲۲	روسیه	۵۵/۷۵	۳۷/۶۱	۱۴۴/۱۷
۹	VICGES۱۰۴	قرقیزستان	۴۸/۰۱	۶۷/۱	۳۴۲/۹
۱۰	VICGES۱۰۸	قرقیزستان	۴۸/۰۱	۶۷/۱	۳۴۲/۹
۱۱	VICMAS۱۳۴	مجارستان	۴۷/۲۶	۱۹/۱۵	۳۷۸/۲
۱۲	VICENS۱۰۷	انگلیستان	۵۱/۵	۰/۱۱	۱۲/۱۹
۱۳	VICENS۱۱۸	انگلیستان	۵۱/۵	۰/۱۱	۱۲/۱۹
۱۴	VICASS۱۲۷	اسلواکی	۴۸/۶۶	۱۹/۶۸	۱۰۸۱/۱۲
۱۵	VICGES۱۱۹	آلمان	۵۱/۱۵	۱۰/۴۵	۴۵۹/۹۴
۱۶	VICHOS۱۳۰	هلند	۵۲/۱۱	۵/۲۸	۷/۹۲
۱۷	VICSWS۱۲۳	سوئیس	۴۶/۸۱	۸/۲۱	۱۷۷۷/۵۹
۱۸	VICSWS۱۲۴	سوئیس	۴۶/۸۱	۸/۲۱	۱۷۷۷/۵۹
۱۹	VICROS۱۱۴	رمانی	۴۵/۹۳	۲۴/۹۶	۵۹۶/۱۸
۲۰	VICROS۱۲۰	رمانی	۴۵/۹۳	۲۴/۹۶	۵۹۶/۱۸
۲۱	VICSPS۱۱۵	اسپانیا	۴۰/۲۷	۳/۷۳	۸۹۵/۸
۲۲	VICUNS۱۰۶	نامعلوم	-	-	-

مواد و روش‌ها

جمعیت‌های اسپرس زراعی مورد بررسی شامل ۵ توده اسپرس ایرانی و ۱۷ توده خارجی بود که از طریق جمع‌آوری مستقیم و نمونه‌گیری از بانک ژن (IPK آلمان و USDA آمریکا) حاصل شد (جدول ۱). از یک جمعیت یونجه محلی (*Medicago sativa*) به‌عنوان شاهد نیز استفاده شد. تعداد دو بذر از هر توده در گلدان‌های پلاستیکی متوسط در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه صنعتی اصفهان در بهار ۱۳۹۰ کشت شد. دو هفته پس از رشد گیاهچه‌ها، از هر جمعیت ۱۰ نمونه به‌طور تصادفی انتخاب و از برگ‌های سالم و تازه هر گیاه نمونه-برداری صورت گرفت. استخراج DNA از نمونه‌های برگی اسپرس با استفاده از روش Murray و Thompson (۱۹۸۰) انجام شد. به‌منظور تعیین کیفیت و کمیت DNA از ژل ۰/۷ درصد آگارز در TBE 0.5X، رنگ‌آمیزی اتیدیوم برماید (۱۰ mg/ml) و دستگاه .GEL Doc استفاده شد.

با توجه به اینکه ریزماهواره‌ها (SSR) در جنس *Onobrychis* شناخته شده نیستند، غربال کردن SSRهای شناسایی شده در جنس *Medicago*، امکان یافتن نواحی مشابه بر روی ژنوم *Onobrychis* را فراهم می‌کند. در این مطالعه تعداد ۲۶ جفت آغازگر SSR و EST-SSR از جنس *Medicago* با محتوی اطلاعات چند شکلی بالا (Polymorphism Information Content) از منابع مختلف انتخاب شدند (جدول ۲).

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) برای نمونه‌ها در حجم ۱۵ میکرولیتری شامل ۱/۵ میکرولیتر بافر ۱۰x، ۱/۵ میکرولیتر کلرید منیزیم، یک واحد *Taq* DNA polymerase، ۰/۳ میلی‌مولار dNTPs، ۰/۲۵ میکرومولار از هر آغازگر و ۵۰ نانوگرم DNA ژنومی از هر نمونه تهیه شد. واکنش در دستگاه ترموسایکلر به‌صورت یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه در ۹۴°C به‌مدت ۴ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشت سازی ثانویه در ۹۴°C به‌مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگرها به رشته DNA در دمای ۵۵°C–۵۰ به‌مدت ۴۵ ثانیه و بسط قطعات DNA سنتز شده در ۷۲°C به‌مدت ۲ دقیقه و یک چرخه بسط نهایی در ۷۲°C به‌مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصول زنجیره‌ای پلی‌مراز روی ژل اکریلامید ۱۲ درصد الکتروفورز شد و رنگ‌آمیزی با نیترات نقره صورت گرفت.

برای هر آغازگر بر اساس وجود و یا عدم وجود باند به-صورت صفر و یک امتیازدهی شد و ماتریس اولیه داده‌ها تهیه شد. از ضریب همبستگی کوفنتیک با استفاده از نرم‌افزار NTSYS version 2.02 به‌منظور تعیین مناسبترین ضریب تشابه و الگوریتم خوشه‌بندی استفاده شد (Saracli *et al.*, 2013). براین اساس، به‌منظور گروه‌بندی جمعیت‌ها از تجزیه خوشه‌ای به‌روش اتصال کامل و بر مبنای ماتریس شباهت-های تطابق ساده استفاده شد. روابط بین جمعیت‌ها با استفاده از رسم PCoA به‌کمک نرم‌افزار NTSYS version 2.02 صورت گرفت (Rohlf, 1998). درصد چندشکلی هر آغازگر از تقسیم تعداد جایگاه‌های چند شکل بر تعداد کل جایگاه‌ها به‌دست آمد. محتوی اطلاعات چندشکلی (PIC) از روش زیر برای هر باند محاسبه شد (Botstein *et al.*, 1980):

$$PIC = 1 - \sum_{j=1}^{n} P_{ij}^2$$

در این رابطه P_{ij} فراوانی iمین آلل در نشانگر i ، جمعیت j و n تعدا آلل می‌باشد.

جدول ۲– مشخصات و اطلاعات مربوط به آغازگرهای ریزماهواره‌ای مورد استفاده در این مطالعه

نام نشانگر	نوع نشانگر	منبع	توالی (5'-3')
AL377524	SSR	Ronfort *et al., 2009*	F: CAAATTTGGAGAAGGCGAAG
			R: CGGTCTCTTCATATTCGCTGA
Aac004	SSR	He *et al.*, 2009	F: AAGGCAAATAAGCTAGACCCA
			R: AGCTCGGGACCCATTCTTAT
Aac009	SSR	He *et al.*, 2009	F: TGTTGAGGTCATGGTGGCTA
			R: AGCTCGGGACCCCTAAAAT
Act011	SSR	He *et al.*, 2009	F: GCATGATCAAGCTAGAAACCCT
			R: TCTCAGACTCGAATTATCCAAGC
mtgsp_005e04.taa.9-1	SSR	Chu *et al., 2010*	F: ACTCGCATCACATTGTGGAA
			R: GACTTTGTCGGGTGGTCCTA
MTIC326	SSR	Julier *et al., 2003*	F: GATCACCCTTTATGGAGTTTGAA
			R: CGACTTCAATTGACCCCCTA
Actt001	SSR	He *et al.*, 2009	F: AATTGTGAGCTTTCCTCTTCC
			R: TACGACTCTAGACACTTTATTAGGC
MTIC67	EST-SSR	Arraouadi *et al.*, 2009	F: AGCAGCAAGAAGCACAAGGT
			R: CAATGTGCGTGCATTGTGTA
Actt003	SSR	*Chu et al., 2010*	F: ACACACACACACACACACTTAG
			R: GACAAGGTGTTGCAATCTC
AL373844	EST-SSR	Eujayl *et al., (2004)*	F: AGGAAGAGCAAGCAAGAGGA
			R: CATGCACTCACCCTTGTATCA
Aac001	SSR	He *et al.*, 2009	F: ACTACGACTCTAGACACTTTATTAG
			R: CTTCTCTCTTTCTCATACTCTTC
Aac002	SSR	He *et al.*, 2009	F: TTGAAATTGGCAAACCCAC
			R: AAAGGTGCAGAAACCCTC
Aac008	SSR	He *et al.*, 2009	F: ACTCTTAGGAGCAGGATCAC
			R: GCAGAAGCTCTAGTGGTATG
Aat002	SSR	He *et al.*, 2009	F: AATTAATGGATTGACACCC
			R: TGTGTGTGTGTGTGTGGG
Act020	SSR	He *et al.*, 2009	F: TGTTCAGAGTTAAGTGCAGCG
			R: TCAAGTGCTCACCCAAACAA
Aggt004	SSR	He *et al.*, 2009	F: AAATGATATTGTAGGAAGATCGTGC
			R AGTTATGAGGGAGCACCGAG

ادامه جدول ۲– مشخصات و اطلاعات مربوط به...

نام نشانگر	نوع نشانگر	منبع	توالی (5'-3')
AFct 45	SSR	Julier *et al., 2003*	F: TAAAAAACGGAAAGAGTTGGTTAG
			R: GCCATCTTTTCTTTTGCTTC
B14B03	SSR	Julier *et al., 2003*	F: GCTTGTTCTTCTTCAAGCTC
			R ACCTGACTTGTGTTTTATGC
MTIC299	SSR	Julier *et al., 2003*	F: AGGCTGTTGTTACACCTTTGTC
			R: AAATGCTTAAATGACAAAT
AL376369	EST-SSR	Eujayl *et al., (2004)*	F: CCAAGAAGAGCAGCAGAAAGA
			R: TGCAACCAGCAACTACAAGAA
AW776153	EST-SSR	Bahar *et al., (2006)*	F: TGGGTGGAGGAAATTACGAC
			R: CCACATATGTTGCTGTTTCCA
TCI2878	EST-SSR	Bahar *et al., (2006)*	F: CACTCACACTCAACACACAACA
			R: ACGCCTCTCTTTCCGATCTT
TCI2985	EST-SSR	Bahar *et al., (2006)*	F: CCAACATCCTTTTCCTTTCC
			R: TTCTCTCCATACCTCGCTCAA
Afct32	EST-SSR	Diwan *et al.*, 1997	F: TTTTTGTCCCACCTCATTAG
			R: TTGGTTAGATTCAAAGGGTTAC
MTIC189	SSR	Julier *et al., 2003*	F: CAAACCCTTTTCAATTTCAACC
			R: ATGTTGGTGGATCCTTCTGC
MTIC345	SSR	Julier *et al., 2003*	F: TCCGATCTTGCGTCCTAACT
			R: CCATTGCGGTGGCTACTCT

سپس گروه‌بندی جمعیت‌ها بر طبق اسپرس زراعی ایرانی و خارجی، همچنین برآوردهای پارامترهای جریان ژنی (Nm)، شاخص تمایز ژنی (Gst)، شاخص شانون (I) و شاخص نی (He) با استفاده از نرم‌افزار Popgene 32 محاسبه شد (Yeh *et al.*, 1999). جهت بررسی تنوع بین جمعیت‌های اسپرس زراعی ایرانی و خارجی از نرم‌افزار ARLIQUIN 3 استفاده شد (Excoffier *et al.*, 2005).

نتایج

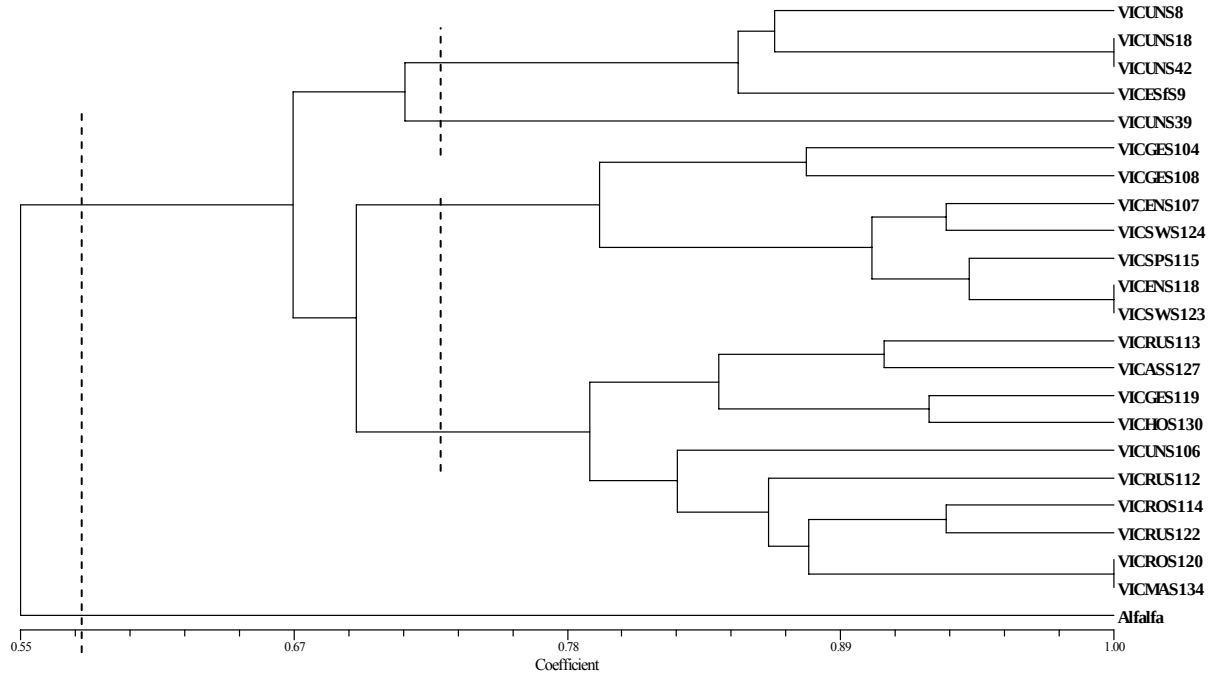
از مجموع ۲۶ جفت آغازگر SSR و EST-SSR از جنس *Medicago* (جدول ۲)، تعداد ۸ جفت آغازگر SSR و یک جفت آغازگر EST-SSR در اسپرس چندشکلی نشان دادند (جدول ۳)، که برای بررسی تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های اسپرس زراعی مورد استفاده قرار گرفت. تعداد ۹ جفت آغازگر ریزماهواره مورد استفاده برای ارزیابی ۲۲ جمعیت اسپرس در مجموع توانست تعداد ۴۴ آلل را تفکیک نماید. تعداد آلل‌ها برای هر مکان بین ۴ تا ۶ متغیر بود و اندازه قطعات تکثیری در دامنه ۱۰۰ تا ۴۰۰ جفت باز قرار داشت. محتوی اطلاعات چند شکل برای جایگاه‌های ریزماهواره‌ای مورد مطالعه در فاصله ۰/۲۰ تا ۰/۴۳ متغیر بود و میانگینی برابر ۰/۳۳ داشت (جدول ۳).

جدول۳– اطلاعات حاصل از جایگاه‌های ریزماهواره‌ای مورد استفاده در بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های اسپرس

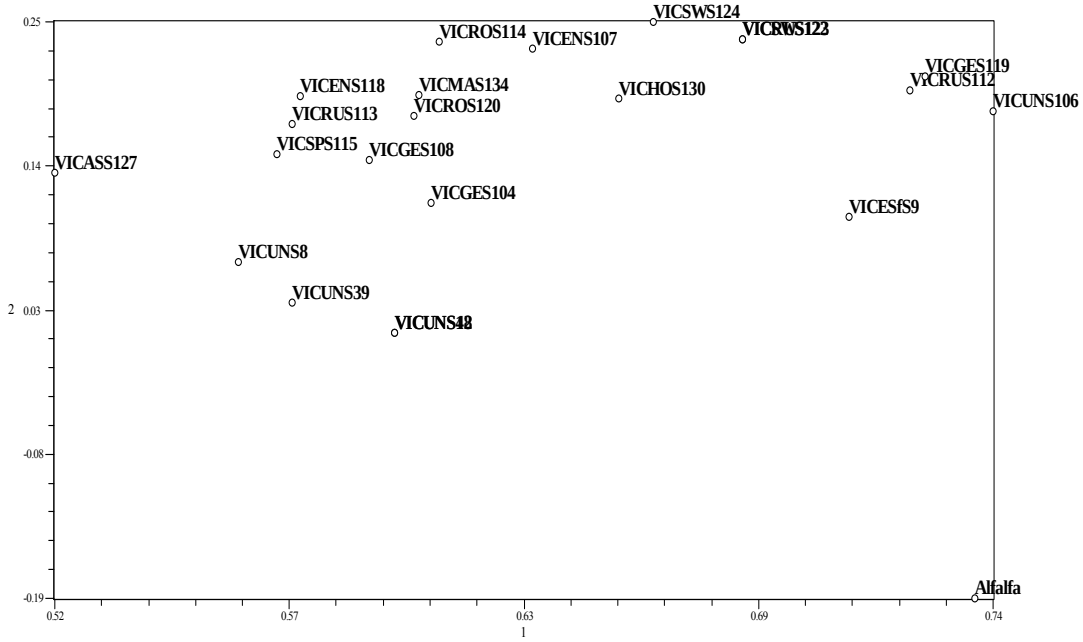
نام نشانگر	PIC	تعداد آلل
MTIC59	۰/۲۲	۴
Aac004	۰/۴۳	۵
Aac009	۰/۳۴	۶
Act011	۰/۳۴	۴
mtgsp_005e04.taa.9-1	۰/۴۳	۴
MTIC326	۰/۲۹	۴
Actt001	۰/۴۱	۵
Actt003	۰/۲۰	۶
AL373844	۰/۳۲	۵
میانگین	۰/۳۳	۴/۷

در این مطالعه، ضریب همبستگی کوفنتیک در الگوریتم UPGMA با ضریب تطابق ساده (Simple matching) برابر با ۰/۸۱ بود. شکل ۱ نمودار خوشه‌ای حاصل از ضریب تطابق ساده و الگوریتم UPGMA را در ۲۳ جمعیت مورد مطالعه نشان می‌دهد. بر این اساس، ۲۲ جمعیت اسپرس از جمعیت محلی یونجه جدا شد و۲۲ جمعیت اسپرس در دو گروه طبقه‌بندی شدند. گروه اول با ۵ جمعیت متعلق به اسپرس ایرانی، گروه دوم با ۱۷ جمعیت متعلق به اسپرس‌های خارجی بود. گروه دوم به دو زیر گروه تقسیم-بندی شد، به‌طوری که زیر گروه اول با ۷ جمعیت شامل ژنوتیپ‌هایی با منشأ انگلستان، قرقیزستان، سوئیس و اسپانیا بود (اکثراً از اروپای غربی) و زیر گروه دوم با ۱۰ جمعیت شامل نمونه‌هایی با منشأ روسیه، رومانی، اسلواکی، هلند، مجارستان و آلمان (اکثراً از اروپای مرکزی–شرقی) بود.

از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی متعادل (PCoA) به‌منظور روش مکمل تجزیه خوشه‌ای برای گروه‌بندی جمعیت‌ها استفاده شد. نتایج نشان داد که مؤلفه اول ۵۵/۷۵ درصد، مؤلفه دوم ۱۹/۹۶ درصد و مؤلفه سوم ۶/۷۲ درصد را به خود اختصاص داده و در مجموع ۸۲/۴۴ درصد از کل تغییرات را توجیه کردند. نمودار دو بعدی مقادیر دو مؤلفه اول در شکل ۲ نشان داده شده است.



شکل ۱– گروه‌بندی ۲۲ جمعیت اسپرس و یک جمعیت یونجه بر اساس نشانگر ریزماهواره با استفاده از ضریب تشابه تطابق ساده و الگوریتم UPGMA



شکل ۲– نمودار دو بعدی حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی متعادل (PCoA) در ۲۲ جمعیت اسپرس و یک جمعیت یونجه بر اساس نشانگر ریزماهواره

به منظور مطالعه ساختار تنوع موجود در ژرم‌پلاسم مورد بررسی در این مطالعه (۲۲ جمعیت اسپرس شامل دو گروه: ۵ جمعیت اسپرس زراعی ایرانی و ۱۷ جمعیت اسپرس زراعی خارجی) از تجزیه و تحلیل مولکولی (AMOVA) استفاده شد. میزان ۱۳/۶ درصد از کل تنوع به تفاوت بین جمعیت‌های اسپرس زراعی ایرانی و خارجی و ۶۹/۵ درصد به تفاوت درون جمعیت‌ها اختصاص داشت (جدول ۴). در این مطالعه، شاخص تثبیت (F_{st}) برابر با ۰/۲۷ برآورد شد.

جدول ۴– تجزیه واریانس مولکولی برای تمایز دو گروه جمعیت اسپرس زراعی ایرانی و خارجی

منابع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات	اجزای واریانس	درصد تنوع	شاخص تثبیت F_{st}
کل	۲۱	۸۳/۰۴	۴/۷۸		۰/۲۷
بین گروه‌ها (اسپرس زراعی ایرانی و خارجی)	۱	۱۳/۵۷	۱/۳۱	۲۷/۳۴	
درون گروه‌ها	۲۰	۶۹/۴۷	۳/۴۷	۷۲/۶۶	

برآورد پارامترهای جمعیت به‌طور مجزا برای اسپرس زراعی ایرانی و خارجی در جدول ۵ آورده شده است. آلل‌های مشاهده شده (Na) و مورد انتظار (Ne) برای کل ژرم‌پلاسم مورد مطالعه به‌ترتیب برابر با ۱/۸ و ۱/۵ بود. تنوع ژنی نی (H) و شاخص شانون (I) در جمعیت‌های اسپرس زراعی خارجی بالاتر از اسپرس زراعی ایرانی بود. درصد چندشکلی (PPB) در جمعیت‌های زراعی ایرانی و خارجی به‌ترتیب برابر با ۳۶ و ۷۷ درصد بود. در این ژرم‌پلاسم، ضریب تمایز ژنی برابر با ۰/۲۵ و جریان ژنی (Nm) برابر با ۱/۴۲ محاسبه شد.

جدول۵– اطلاعات مربوط به پارامترهای ژنتیکی در ژرم‌پلاسم اسپرس مورد مطالعه

نام	تعداد جمعیت	Na	Ne	H	I	PPB%	Gst	Nm
اسپرس زراعی (***O. vicifollia***)	۲۲	۱/۸۱	۱/۵۰	۰/۲۶	۰/۴۰	۸۱/۸۲	۰/۲۵	۱/۴۲
ایرانی	۵	۱/۳۶	۱/۴۵	۰/۱۲	۰/۱۹	۳۶/۳۶	–	–
خارجی	۱۷	۱/۷۷	۱/۳۶	۰/۲۴	۰/۳۷	۷۷/۲۷	–	–

تعداد آللهای مشاهده شده=Na تعداد آللهای مورد انتظار =Ne شاخص نی= Hشاخص شانون= I درصد چند شکلی=PPB%
شاخص تمایز ژنی= Gst جریان ژنی=Nm

بحث

در این مطالعه، محتوی اطلاعات چند شکل برای جایگاه‌های ریزماهواره‌ای مورد مطالعه در فاصله ۰/۲۰ تا ۰/۴۳ متغیر بود و میانگینی برابر ۰/۳۳ داشت. دامنه چند-شکلی برای ۶ جفت آغازگر ریزماهواره مورد ارزیابی در ۲۵ توده اسپرس بین ۰/۴۵ تا ۰/۸۵ گزارش شده است (Demdoum *et al.*, 2011). در مطالعه دیگری مقادیر محتوی اطلاعات چند شکل بین ۰/۰۶- تا ۰/۳۵ برای ۱۸ جفت آغازگر ریزماهواره مورد مطالعه در ۵۸ نمونه اسپرس برآورد شد (Avci *et al.*, 2014). در مطالعه حاضر، آغازگرهای mtgsp_005e04.taa.9 و Aac004 با ایجاد بالاترین محتوی اطلاعات چند شکل و رهگیری به‌ترتیب ۴ و ۵ آلل اختصاصی به‌عنوان نشانگرهای مناسب جهت ارزیابی‌های ژنتیکی در اسپرس شناخته شدند. تنوع آللی حاصل در این مطالعه با تنوع ۷–۵ آللی به‌دست آمده توسط Demdoum و همکاران (۲۰۱۱) در مجموعه‌ای از ژنوتیپ‌های اسپرس با استفاده از آغازگرهای ریزماهواره مشابه بود. این محققین تعداد کل ۳۵ آلل را برای ۶ جفت آغازگر ریزماهواره و میانگین تعداد آلل ۵/۸۳ را برای هر آغازگر ریزماهواره در اسپرس گزارش کردند. تعداد آلل برای هر آغازگر در اسپرس در مقایسه با یونجه کمتر بود. به‌طوری که تعداد آلل در یونجه بین ۱۴–۴ گزارش شده است (Falahati-Anbaran *et al.*, 2007). همچنین Bahar و همکاران (۲۰۰۶) از چهار جایگاه ریزماهواره‌ای EST-SSR و یک جایگاه ریزماهواره ژنومی برای تخمین تنوع ژنتیکی در شش جمعیت یونجه ایرانی و یک جمعیت رنجر آمریکایی استفاده کردند که در مجموع ۴۶ آلل برای این جایگاه‌ها شناسایی شد و تعداد آلل‌ها بین ۶ تا ۱۱ آلل متغیر بود. با توجه به تتراپلوئید بودن اسپرس و اینکه جمعیت‌های مورد مطالعه مخلوطی از ۱۰ نمونه مختلف بود، تعدادآلل‌های مورد بررسی می‌تواند کم برآورد شود و فقط یکسری از آلل‌ها امکان تظاهر داشته باشند.

در این مطالعه، ۲۲ جمعیت اسپرس در دو گروه طبقه-بندی شدند. گروه اول با ۵ جمعیت متعلق به اسپرس ایرانی، گروه دوم با ۱۷ جمعیت متعلق به اسپرس‌های خارجی بود. گروه دوم به دو زیر گروه تقسیم‌بندی شد، به‌طوری که زیر گروه اول با ۷ جمعیت شامل ژنوتیپ‌هایی با منشأ اروپای غربی و زیر گروه دوم با ۱۰ جمعیت شامل نمونه‌هایی با منشأ اروپای مرکزی–شرقی بود. قرار گرفتن گروه‌های اسپرس ایرانی و خارجی در گروه‌های مجزا حاکی از وجود تنوع ژنتیکی بالا در ژرم‌پلاسم مورد بررسی در این تحقیق است. در این زمینه Zarrabian و همکاران (۲۰۱۳) در مطالعه‌ای ۷۵ توده اسپرس زراعی را با استفاده از ۲۲ آغازگر ISSR به دو گروه ایرانی و خارجی گروه‌بندی کردند. همچنین این محققین توانستند هر کدام از گروه‌های اسپرس ایرانی و خارجی مورد مطالعه را بر اساس مناطق جغرافیایی به چهار گروه تقسیم‌بندی کنند. با استفاده از ۱۸ جفت آغازگر ریزماهواره، Avci و همکاران (۲۰۱۴) تعداد ۵۸ توده از گونه‌های مختلف اسپرس را طبقه‌بندی کردند. همچنین، تجزیه خوشه‌ای بر اساس آغازگرهای ریزماهواره-ای EST-SSR توانست جمعیت رنجر آمریکایی یونجه را از جمعیت‌های ایرانی جدا کند و یونجه‌های ایرانی را به دو دسته گرمسیری و سردسیری گروه‌بندی کند (Bahar *et al.*, 2006).

نحوه پراکنش اسپرس زراعی ایرانی و خارجی در تجزیه به مؤلفه‌های اصلی متعادل با نتایج حاصل از تجزیه خوشه-ای مطابقت داشت. به‌طوریکه یونجه به دور از گروه‌های اسپرس قرار گرفت و اسپرس زراعی ایرانی و خارجی از یکدیگر تفکیک شدند. در مطالعه‌ای با بررسی ۷۵ نمونه اسپرس زراعی جمع‌آوری شده از مناطق جغرافیایی مختلف گزارش شده است که اگرچه سه مؤلفه اول ۲۶ درصد از کل تغییرات را توجیه کرد اما تجزیه به مؤلفه‌های اصلی ارقام ایرانی را از خارجی جدا کرد (Zarrabian *et al.*, 2013). تجزیه به مؤلفه‌های اصلی ۶۰ درصد از کل تغییرات را در ۲۳ توده اسپرس زراعی، دو گونه وحشی اسپرس (*O. pyrenaica* و *O. argentea*) و شبدر (*Trifolium repens*) توجیه کرد و با استفاده از این تجزیه توده‌های اسپرس زراعی از دو گونه وحشی اسپرس و شبدر تفکیک شدند. همچنین، ۲۳ توده اسپرس زراعی بر اساس منشأ جغرافیایی به سه گروه با منشا "توده‌های انگلیس"، "اروپای شرقی" و "فرانسه و ایتالیا" گروه‌بندی شدند (Demdoum *et al.*, 2011). بنابراین، می‌توان اظهار داشت که جمعیت‌های ایرانی و خارجی کاملا متفاوت می‌باشد و نیاز به ارزیابی مجدد آن‌ها نیست.

بر اساس تجزیه و تحلیل مولکولی، میزان ۱۳/۶ درصد از کل تنوع به تفاوت بین جمعیت‌های اسپرس زراعی ایرانی و خارجی و ۶۹/۵ درصد به تفاوت درون جمعیت‌ها اختصاص داشت. تنوع بالای بین جمعیت‌ها ناشی از ساختار ژنتیکی متفاوت جمعیت‌ها می‌باشد. در این مطالعه، شاخص تثبیت (F_{st}) برابر با ۰/۲۷ نشان‌دهنده تفکیک و تمایز بالا بین جمعیت‌های اسپرس زراعی و خارجی است. مقادیر F_{st} بین ۰-۰/۰۵ تمایز کم، ۰/۰۵-۰/۱۵ تمایز متوسط، ۰/۱۵-۰/۲۵ تمایز زیاد و بالای ۰/۲۵ تمایز خیلی زیاد را بین جمعیت‌ها بیان می‌کند (Wright, 1978). نتایج تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی بر اساس نشانگر ISSR نشان داد که ۴۸/۱۹ درصد از تنوع به تفاوت بین گروه‌های اسپرس زراعی ایرانی و خارجی، ۱۰/۱۸ درصد به تفاوت بین مناطق جغرافیایی درون هر گروه و ۴۱/۶۳ درصد از کل تغییرات مربوط به تفاوت بین ارقام بود (Zarrabian *et al.*, 2013). در مطالعه‌ای بر روی ۵ جمعیت اسپرس با استفاده از نشانگر RAPD گزارش شد ۸۹ درصد از کل تنوع مربوط به درون جمعیت‌ها و ۱۰/۹ درصد مربوط به بین جمعیت‌ها می‌باشد که نشان می‌دهند این گونه تمایل به دگرگشنی دارد (Nosrati *et al.*, 2012). در مطالعه دیگری، تجزیه و تحلیل مولکولی در جمعیتی شامل ۲۰۰ توده لوبیا (*Phaseolus vulgaris*) از نواحی جغرافیایی مختلف و بر اساس داده‌های ۷ جفت آغازگر SSR نشان داد که غالب تنوع (۷۰ درصد) در این جمعیت مربوط به تنوع درون توده‌ها است (Gill-Langarica *et al.*, 2011). در مطالعه‌ای با استفاده از ۹ آغازگر SRAP بر روی ۴۸۰ نمونه گیاه *Pinus koraiensis* (جمع‌آوری شده از ۲۴ منطقه جغرافیایی) گزارش کردند که ۹۲/۳۵ درصد از کل تنوع در تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی مربوط به تنوع درون مناطق جغرافیایی و ۷/۶۵ درصد از تنوع مربوط به بین مناطق جغرافیایی بود (Feng *et al.*, 2009).

با توجه به اینکه ضریب تمایز ژنی به سه دسته پایین (Gst>0.05)، متوسط (Gst=0.05-0.15) و بالا (Gst>0.15) تقسیم‌بندی شده است (Nei *et al.*, 1978; Feng *et al.*, 2009). در این مطالعه، ضریب تمایز ژنی با میزان ۰/۲۵ درگروه بالا قرار گرفت. جریان ژنی (Nm) در این ژرم‌پلاسم برابر با ۱/۴۲ محاسبه شد. وجود جریان ژنی در جمعیت‌ها به سه دسته تقسیم‌بندی می‌شود: مقادیر جریان ژنی کمتر از یک نشان‌دهنده هموزیگوسیتی در جمعیت است، مقادیر بالاتر از یک نشان‌دهنده تمایز و تفکیک شدید (هتروزیگوسیتی) میان جمعیت‌ها و مقادیر بالاتر از ۴ منجر به ایجاد واحد تصادفی در جمعیت می‌گردد (Wright, 1978). بر این اساس، جریان ژنی بالایی در میان جمعیت اسپرس زراعی ایرانی و خارجی در این مطالعه وجود داشت.

در مجموع نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد نشانگرهای به‌دست آمده از جنس *Medicago* می‌توانند منبع خوبی برای شناسایی مکان‌های ریزماهواره در اسپرس باشد و استفاده از نشانگرهای ریزماهواره ظرفیت قابل توجهی جهت بررسی

روابط خویشاوندی و تنوع ژنتیکی را در اسپرس داشته باشد. همچنین، نشانگرهای SSR مورد استفاده در این آزمایش، چندشکلی بالایی را نشان دادند و تنوع ژنتیکی موجود در ژرم‌پلاسم مورد مطالعه را با کارایی بالایی به تصویر کشیدند. در این مطالعه، جمعیت‌های اسپرس ایرانی و خارجی در گروه‌های مجزا قرار گرفتند که حاکی از وجود تنوع ژنتیکی بالا در ژرم‌پلاسم مورد بررسی در این تحقیق است. به‌علاوه، تنوع ژنتیکی بالا بین جمعیت‌های اسپرس ایرانی و خارجی مورد مطالعه، برای انجام برنامه‌های اصلاحی و دورگ‌گیری به‌منظور رسیدن به حداکثر هتروزیس مناسب می‌باشد.

منابع مورد استفاده

- Arraouadi, S., Badri, M., Abdul Jaleel, C., Djebali, N., Ilahi, H., Huguet, T., and Aouani, M. E., 2009. Analysis of genetic variation in natural populations of *Medicago truncatula* of Southern Tunisian ecological areas, using morphological traits and SSR Markers. Tropical Plant Biology, 2: 122-132.
- Avci, S., Ilhan, E., Erayman, M., and Sancak, C., 2014. Analysis of *Onobrychis* genetic diversity using SSR markers from related legume species. The Journal of Animal and Plant Sciences, 24: 556-566.
- Awasthi, A.K., Nagaraja, G.M., Naik, G.V., Kanginakudru, S., Thangavelu, K., and Nagaraju, J., 2004. Genetic diversity and relationships in mulberry (genus *Morus*) as revealed by RAPD and ISSR marker assays. BMC Genetics, 5:1–9.
- Bahar, M., Ghobadi, S., Erfani Moghaddam, V., Yamchi, A., Talebi Bedaf, M., Kaboli, M.M., and Mokhtarzadeh, A.A., 2006. Evaluating genetic diversity of Iranian alfalfa local populations using expressed sequence tags (ESTs) microsatellites. Journal of Science and Technology of Agriculture and Nature Resources, 10: 141-153.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., and Davis, R.W., 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. American Journal of Human Genetics, 32: 314-331.
- Brummer, E.C. 1999. Capturing hetrosis in forage crop cultivar development. Crop Science, 39: 943-954.
- Carbonero, C.H., Mueller-Harvey, I., Brown, T.A., and Smith, L., 2011. Sainfoin (*Onobrychis viciifolia*): a beneficial forage legume. Plant Genetic Resources: Characterization Utilization, 9: 70–85.
- Chu, H.J., Yan, J., Hu, Y., Wang, H.C., and Li, J.Q., 2010. Cross-species amplification of 92 microsatellites of *Medicago truncatula*. Molecular Ecology Resources, 10: 150–155.
- Choudhary, S., Sethy, N.K., Shokeen, B., and Bhatia, S. 2009. Development of chickpea EST-SSR markers and analysis of allelic variation across related species. Theoretical and Applied Genetics, 118: 591- 608.
- Demdoum, S., Munoz, F., Delgado, I., Valderrabano, J., and Wunsch, A., 2011. EST-SSR cross-amplification and genetic similiarity in *Onobrychis* genus. Genetic Resources and Crop Evolution, 59: 253-260.
- Diwan, N., Bhagwat, A.A., Bauchan, G.R., and Cregan P.B., 1997. Simple sequence repeat (SSR) DNA markers in alfalfa and perennial and annual *Medicago* species. Genome, 40: 887-895.
- Excoffier, L., Laval, G., and Schneider, S., 2005. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. Evolution Bioinformatics Online, 1:47–50.
- Eujayl, I., Sledge, M.K., Wang, L., May, G.D., Chekhovsiy, K., Zwonitzer, J.C., and Mian, M.A.R., 2004. *Medicago truncatula* EST-SSR reveal cross-species markers for *Medicago* spp. Theoretical and Applied Genetics, 108: 414-422.
- Falahati-Anbaran, M. , Habashi, A.A., Esfahany, M., Mohammadi, S.A., and Ghareyazie, B., 2007. Population genetic structure based on SSR markers in alfalfa (*Medicago sativa* L.) from various regions contiguous to the centers of origin of the species. Journal of Genetics, 86: 59-63.
- Feng, F., Chen, M., Zhang, D., Sui, X., and Ha, S. 2009. Application of SRAP in the genetic diversity of *Pinus koraiensis* of different provenances. African Journal of Biotechnology, 8: 1000-1008.
- Gill-Langarica, H.R., Muruaga-Martinez, J.S., Patricia Vargas-Vazquez, M.L., Rosales-Serna, R., and Mayek-Perez, N., 2011. Genetic diversity analysis of common beans based on molecular markers. Genetics and Molecular Biology, 34: 595-605.
- He, C., Xia, L., Campbell, T.A., and Bauchan, G.R., 2009. Development and characterization of SSR markers and their use to assess genetic relationships among alfafa germplasms. Crop Science, 49: 2176-2186.
- Hume, L. J., Withers, N. J., and Rhoades, D. A., 1985. Nitrogen fixation in sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) 2. Effectiveness of the nitrogen-fixing system. New Zealand Journal of Agricultural Research, 28: 337-348.

- Julier, B., Flajoulot, S., Barre, P., Cardinet, G., Santoni, S., Huguet, T., and Huyghe, C., 2003. Construction of two genetic linkage maps in cultivated tetraploid alfalfa (*Medicago sativa*) using microsatellite and AFLP markers. BMC Plant Biology, 9: 1471-2229.
- Kalia, R.K., Rai, M.K., Kalia, S., Singh, R., and Dhawan, A.K., 2011. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. Euphytica, 177: 309-334.
- Kuleung, C., Baenziger, P.S., and Dweikat, I., 2004. Transferability of SSR markers among wheat, rye and triticale. Theoretical and Applied Genetics, 108: 1147-1150.
- Murray, M.G., and Thompson, W.F., 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research, 8: 4321– 4325.
- Nei, M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics, 89: 583−590.
- Nosrati, H., Feizi, M.A.H., Tarrah, S.S., and Haghighi, A.R., 2012. Population genetic variation in sainfoin (Fabaceae) revealed by RAPD markers. Analele Universitatii din Oradea, Fascicula Biologie, 19: 11-16.
- Rohlf, F.J., 1998. NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.00. Exeter Software, Setauket, NY.
- Ronfort, J., Bataillon, T., Santoni, S., Delalande, M., David, J.L., and Prosperi, J.M., 2006. Microsatellite diversity and broad scale geographic structure in a model legume: building a set of nested core collection for studying naturally occurring variation in *Medicago truncatula*. BMC Plant Biology, 6: 1471-2229.
- Saha, M.C., Rouf Mian, M.A., Eujayl, I., Zwonitzer, J.C., Wang, L., and May, G.D., 2004. Tall fescue EST-SSR markers with transferability across several grass species. Theoretical and Applied Genetics, 109: 783-791.
- Saracli, S., Dogan, N., and Dogan, I., 2013. Comparison of hierarchical cluster analysis methods by cophenetic correlation. Journal of Inequalities and Applications, 203: 1-8.
- Varshney, R.K., Graner, A., and Sorrellls, M.E., 2005. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. Trends Biotechnology, 23: 48-55.
- Werlemark, G., Uggla, M., and Nyborn, H., 1999. Morphological and RAPD markers show a highly skewed distribution in a pair of reciprocal crosses between hemisexual dogrose species, Rosa sect. Caninae. Theoretical and Applied Genetics, 98: 557-563.
- Wright, M.H., 1978. Evolution and Genetics of Population. University of Chicago Press, Chicago.
- Yeh, F.C., Yang, R., and Boyle, T., 1999. Popgene version 1.32: Microsoft Windows-based Freeware for Population Genetic Analysis. University of Alberta, Edmonton.
- Zarrabian, M., Majidi, M.M., and Ehtemam, M.H., 2013. Genetic diversity in a worldwide collection of sainfoin using morphological, anatomical, and molecular markers. Crop Science, 53: 2483-2496.

Exploitation of *Medicago* SSR markers in assessment of genetic diversity in cultivated sainfoin populations

S. Irani[1], **A. Mirlohi**[2], **M.M. Majidi**[3] **and M. Talebi**[4]

1 - PhD student, Department of Agronomy and Plant Breeding, Isfahan University of Technology, Isfahan, I.R.Iran
2 – Prof., Department of Agronomy and Plant Breeding, Isfahan University of Technology, Isfahan, I.R.Iran
3*– Corresponding author, Assoc. Prof. Department of Agronomy and Plant Breeding, Isfahan University of Technology, Isfahan, I.R.Iran.
4– Assist. Prof., Department of Plant Biotechnology, Isfahan University of Technology, Isfahan, I.R.Iran

Received: 02.02.2015 Accepted: 13.07.2015

Abstract

In order to evaluate genetic diversity of 22 cultivated sainfoin accessions collected from different regions of the world, SSR markers from *Medicago* genus were used. Polymorphism information content value ranged from 0.20 to 0.43 with an average of 0.33. The most informative markers were "mtgsp_005e04.taa.9-1" and "Actt004" with the highest polymorphism information content values. Cluster analysis based on SSR markers grouped the sainfoin populations into two main groups (Iranian and exotic cultivate sainfoin) with two sub-clusters for each group. The two sub-clusters of exotic group (B) mostly comprised accessions from Western Europe (BI) and Central and Eastern Europe (BII). The clustering results were also confirmed by principal coordinate analysis. According to the analysis of molecular variance, 13.6% of genetic variation related to among Iranian and exotic cultivated populations and 69.5% related to within-population diversity in the sainfoin populations. The analysis of molecular variance also indicated a fixation index of 0.27 suggesting a high differentiation among Iranian and exotic cultivated populations. Overall, the SSR markers used in this study were highly polymorphic and efficient in revealing the level of genetic diversity present in the studied germplasm.

Keywords: Transferability, polymorphism information content, principal coordinates analysis, cluster analysis.