دو فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۱۸، شمارهٔ ۱، صفحهٔ ۱۱-۱ (۱۳۸۹)

بررسی تنوع ژنتیکی بخشی از یونجه‌های زراعی (غرب و شمال‌غرب) ایران با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره

رحمت محمدی*[۱]، رضا معالی امیری[۲]، محمدرضا نقوی[۳] و محمدمهدی کابلی[٤]

۱ *- نویسنده مسئول مکاتبات، کارشناس ارشد، زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی ومنابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
پست الکترونیک: rm1387@gmail.com
۲- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
۳- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
٤- مربی پژوهش، وزارت جهاد کشاورزی، تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۸۷/۸/۱٤ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۹/۱

چکیده

یونجه زراعی (*M. sativa*) مهمترین گیاه علوفه‌ای دنیاست. مناطق غرب و شمال‌غرب ایران یکی از مناطق مهم یونجه‌کاری کشور است. با توجه به اینکه مطالعات جامعی در خصوص بررسی تنوع ژنتیکی یونجه‌های زراعی این مناطق انجام نشده، در این مطالعه تنوع ژنتیکی ۳٤ توده یونجه زراعی از نواحی غرب و شمال‌غرب ایران به کمک ده جفت آغازگر ریزماهواره ارزیابی شد. در مجموع ۵۱ نوار بدست آمد که ٤۵ نوار چندشکل با متوسط ٤/۵ باند در هر لوکوس شناسایی شد. مقدار PIC با میانگین ۰/۵۵ از ۰/۲۹در آغازگر MAL369471 تا ۰/۸۰ در آغازگر ENOD20 و MI با میانگین ۲/۱ از ۰/۲۹ در آغازگر MAL369471 تا ٤/۰۱ در آغازگر ENOD20 متغیر بود. استان چهارمحال و بختیاری دارای بیشترین میزان تنوع ژنی وشاخص اطلاعاتی شانون (۱۹/ ۰=He و ۰/۲۹ =I) و استان تهران شامل کمترین این مقادیر (۰/۱۳ =He و ۰/۱۳ =I) بود. دندروگرام براساس ماتریس عدم تشابه، نمونه‌ها را به دو گروه اصلی تقسیم کرد که دو توده شهرستان کرج در یک گروه و سایر توده‌ها در گروه دیگری قرار گرفتند. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که نشانگرهای ریزماهواره ابزار مؤثر در ارزیابی تنوع ژنتیکی یونجه‌های بومی ایران است. نتایج این تحقیق می‌تواند در مدیریت ژرم پلاسم در کلکسیون‌های یونجه مفید باشد.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، یونجه زراعی، نشانگرهای ریزماهواره.

مقدمه

یونجه زراعی (*Medicago sativa*) در بین نباتات علوفه‌ای به علت کیفیت خوش خوراکی و غنی بودن از مواد پروتئینی و معدنی به‌عنوان مهمترین گیاه علوفه‌ای دنیا محسوب می‌شود (Tuck *et al.*, 2008). یونجه اهمیت زیادی در تغذیه دام‌ها و افزایش فراورده‌های دامی دارد (Jafari & Godarzi, 2007). در بسیاری از منابع، مناطقی از ایران به‌عنوان مرکز تنوع و خاستگاه یونجه معرفی شده است (Sauer, 1993). یونجه زراعی (*Medicago sativa*) از گونه *M. coerulea* بومی جنوب غربی ایران و شرق آناتولی است (Sauer, 1993). موفقیت به نژادگران گیاهی به میزان تنوع ژنتیکی موجود در گیاهان زراعی و

خویشاوندان وحشی آنها بستگی دارد (Singhet *et al.*, 1989). تنوع ژنتیکی یکی از مهمترین شاخص‌ها جهت انتخاب والدین در برنامه‌های اصلاحی گیاهان می‌باشد (Fareghi *et al.*, 2007). کسب اطلاع از فاصله ژنتیکی در بین افراد یا جمعیت‌ها و آگاهی از روابط خویشاوندی گونه‌های مورد نظر در برنامه اصلاحی، امکان سازمان دهی ذخایر توارثی و نمونه‌گیری مؤثر از ژنوتیپ‌ها و بهره‌برداری بهتر از تنوع در برنامه‌های اصلاحی را فراهم می‌سازد (Sharma *et al.*, 2002). به همین منظور از نشانگرهای مختلفی مانند مورفولوژیک، سیتوژنتیک و ملکولی استفاده می‌شود. نشانگرهای مورفولوژیک به رغم کارایی بالا در تشخیص و طبقه بندی گونه، به علت تأثیرپذیری از محیط، کارآیی کمتری در تعیین میزان تنوع ژنتیکی دارند (Brummer *et al.*, 1991; Echt *et al.*, 1994; Kalo *et al.*, 2000). نشانگرهای ملکولی می‌توانند در جهت رفع این مشکلات با هدف شناسایی پتانسیل ژنتیکی ذخایر توارثی کمک شایانی بنمایند (Kashi *et al.*, 1997). ریزماهواره‌ها یا توالی تکراری ساده (SSR) در میان انواع نشانگرهای ملکولی از بزرگترین امیدها در شناسایی ژنوتیپ‌های مختلف یک گونه هستند (kashi *et al.*, 1997)، این نشانگرها شامل توالی دوگانه تکراری کوتاه (٦-٢ جفت باز) از DNA هستند. این توالی‌ها در نتیجه موتاسیون در تعداد واحدهای تکراری حتی در میان خویشاوندان خیلی نزدیک بسیار متنوع هستند (Lit & luty, 1989). نحوه توارث همبارز آنها، سطح بالای پلی مورفیسم و سادگی کار باعث می‌گردد که آنها ابزار بسیار مناسبی برای تعیین سطح تنوع ژنتیکی، شناسایی و تفکیک ارقام و مدیریت مجموعه ذخایر توارثی تلقی شوند (kashi *et al.*, 1997).

چندین جایگاه ریزماهواره در یونجه معرفی شدند و این جایگاه‌ها در تهیه نقشه‌های ژنتیکی یونجه به کار رفته‌اند (Diwan, 2000). محققان دیگری از جمله Mengoni و همکاران (۲۰۰۰) از این نشانگرها برای مطالعه روابط ژنتیکی بین اکوتیپ‌های زراعی یونجه استفاده کرده‌اند. تعدادی از این جایگاه‌ها را برای بررسی ساختار فاصله‌ای و تنوع ژنتیکی داخل جمعیت در گونه *M. truncatula* بکار برده‌اند (Bonnin & Ronfort, 2001). در بررسی تنوع ژنتیکی بین و درون ۱۹ رقم و لاین یونجه براساس تجزیه خوشه‌ای این ژنوتیپ‌ها را به گروههای مختلفی تقسیم‌بندی کرده و نشان داده‌اند که تنوع ژنتیکی بین ارقام و لاین‌های مختلف یونجه بیشتر از تنوع درون ارقام بود (Musial *et al.*, 2002). محققان دیگر برای تعیین تنوع ژنتیکی ۱۲ جمعیت یونجه آسیایی (*Medicago sativa*) از نشانگرهای SSR استفاده کردند. تعداد ۲ تا ۵ آلل برای هر لوکوس مشاهده کردند. میانگین تنوع ژنتیکی (He) برای هر جمعیت از ۰/۲۵ تا ۰/٤۹ متغیر بود (Li *et al.*, 2009).

این تحقیق به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی توده‌های یونجه زراعی غرب و شمال‌غرب ایران با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره انجام شد.

مواد و روشها

مواد گیاهی

سی و چهار توده یونجه زراعی (شامل ۳۱ توده ایرانی و ۳ توده خارجی) مناطق غرب وشمال‌غربی کشور است از مرکز اصلاح بذر و گیاه اصفهان تهیه و مورد استفاده قرار گرفت (جدول۱). این بذرها درگلدان‌ها کشت شده و از هر توده ۵ بوته برای نمونه‌گیری انتخاب گردید.

نمونه‌های گیاهی پس از خشک شدن در ازت مایع بلافاصله در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استخراج DNA نگهداری شدند. استخراج DNA از برگ‌های جوان (برگ‌های سالم و سبز) براساس روش سقایی معروف انجام شد (Saghai-Maroof, 1984).

شرایط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

در هر واکنش ۵۰ نانوگرم DNA استفاده شد. حجم نهایی واکنش ۱۵ میکرولیتر و ترکیب حاوی بافر 10X (شامل ۵۰ میلی‌مولار پتاسیم، ۱۰میلی‌مولار تریس-اسیدکلریدریک ۰۱٪) به حجم ۱/۵ میلی‌مولار، ۱/۲ میلی‌مولار کلرورمنیزیم، ۱/۵ واحد تک دی ان آ پلیمراز، ۰/۶۷ pmol از هر آغازگر به حجم یک میلی‌مولار، ۰/۶۷pmol از dNTP به حجم یک میلی‌مولار و ۵۰ نانوگرم از DNA ژنومی هر گیاه استفاده شد. ده نشانگر ریزماهواره در بررسی چندشکلی درون و بین توده‌های یونجه‌های زراعی استفاده شد (Diwan, 2000) (جدول ۲).

جدول ۱- منشأ جغرافیایی توده‌های یونجه‌های زراعی بومی مورد استفاده در بررسی تنوع ژنتیکی

کد دسترسی*	محل جمع‌آوری	کد دسترسی	محل جمع‌آوری
۱۳۰۰۰/۴۰-۱	همدان- قریه فامین‌چه	۱۳۰۰۰/۲۰۴	مرند- عریان تپه
۱۳۰۰۰/۱۹۱	همدان- ترکیه	۱۳۰۰۰/۴۳-۱	آذربایجان‌شرقی
۱۳۰۰۰/۱۷۶	همدان- آب انبار	۱۳۰۰۰/۴۳-۲	آذربایجان‌شرقی
۱۳۰۰۰/۱۸۲	همدان- ایتالیا	۱۳۰۰۰/۲۱۲	جلفا- سیه رود
۱۳۰۰۰/۱۸۹	جهاد همدان- ترکیه	۱۳۰۰۰/۲۰۲	جلفا- مرازاد
۱۳۰۰۰/۱۷۹	همدان- ایتالیا	۱۳۰۰۰/۱۷۲	دیواندره- باقرآباد
۱۳۰۰۰/۱۸۶	همدان- ترکیه	۱۳۰۰۰/۲۸۱	چهارمحال و بختیاری
۱۳۰۰۰/۱۷۵	همدان- عبدالرحیم	۱۳۰۰۰/۶۵-۱	کوشک کرج
۱۳۰۰۰/۱۷۰	همدان- ایتالیا	۱۳۰۰۰/۶۵-۲	کوشک کرج
۱۳۰۰۰/۲۰۸	همدان	۱۳۰۰۰/۳۰	ورامین
۱۳۰۰۰/۱۸۰	همدان- اصفهان	۱۳۰۰۰/۲۲۳	شاهرود
۱۳۰۰۰/۱۰۳	همدان- جفه	۱۳۰۰۰/۲۷-۲	شاهرود
۱۳۰۰۰/۱۸۴	همدان- اسدآباد	۱۳۰۰۰/۱۹۳	دامغان
۱۳۰۰۰/۱۹۶	همدان	۱۳۰۰۰/۴۹-۲	کرمانشاه
۱۳۰۰۰/۱۸۵	همدان- کرج	۱۳۰۰۰/۵۷	ایتالیا
۱۳۰۰۰/۲۱۳	گلپایگان- همدان	۱۳۰۰۰/۵۴-۲	ترکیه
۱۳۰۰۰/۲۱۹	مهاباد	۱۳۰۰۰/۵۲-۱	استرالیا

*بذرهای اکوتیپ‌ها با کدهای ارائه شده در جدول، از مرکز اصلاح بذر و گیاه اصفهان قابل دسترس است.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در دستگاه ترموسایکلر (Bio-Rad) شامل برنامه تکثیر چهار مرحله‌ای بود که به صورت تاچ داون (Touch down) انجام شد (جدول ۳). پس از تکثیر قطعات، به منظور بارگذاری DNA ابتدا به نمونه‌ها مقدار ۵ میکرولیتر ماده رنگی فرمامید اضافه شد. مزیت این ماده رنگی در تثبیت DNA داخل چاهک‌ها و مشخص ساختن مسیر مهاجرت در ژل است. به منظور واسرشت سازی DNA تیوب حاوی محصولات PCR را به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ °C قرار داده شد و سپس تیوب‌ها جهت بارگذاری بلافاصله بر روی یخ قرار گرفتند. ۱۰ میکرولیتر محصول PCR بر روی ژل پلی آکریلامید واسرشته‌ساز ٦ درصد بارگذاری شده و با توان ثابت ۹۰ وات به مدت ۹۰ دقیقه الکتروفورز انجام شد و رنگ‌آمیزی ژل با روش نیترات نقره انجام گردید (Bassam *et al.*, 1991).

جدول ۲- برنامه تکثیر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

مرحله	تکرار	دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان
۱	۱	۹٤	۵ دقیقه
۲	۱۰	۹٤	۳۰ ثانیه
		٦۵	۳۰ ثانیه
		۷۲	۱ دقیقه
۳	۲۵	۹٤	۳۰ ثانیه
		۵۵	۳۰ ثانیه
		۷۲	۱ دقیقه
٤	۱	۷۲	۵ دقیقه

تجزیه‌های آماری

داده‌های آزمایش براساس وجود باند (عدد یک) و عدم وجود باند (عدد صفر) برای هر جفت آغازگر اختصاصی محاسبه شد. از نرم افزار POPGENE (v.32) (بر پایه‌ی روش تشابه نی و شانون) و NTYSYS (v.2.02) جهت محاسبه شباهت ژنتیکی استفاده شد.

میزان اطلاعات چندشکلی (Polymorphic Information Content) براساس فرمول $PIC = 1 - \sum_{I=1}^{N} P_I^{\,2}$ و شاخص نشانگر (Marker Index) با استفاده از فرمول $MI = PIC.N.\beta$ برای کلیه آغازگرها محاسبه گردید (Anderson *et al.*, 1993) که PIC میانگین اطلاعات چندشکلی برای هر جفت آغازگر، N تعداد کل باندها برای هر جفت آغازگر و β نسبت چندشکلی برای هر جفت آغازگر می‌باشد. شاخص نشانگر علاوه بر مزایای شاخص PIC، تعداد کل باند را در نظر گرفته و پتانسیل هر آغازگر را برای تولید باند بیشتر روی ژل محاسبه می‌کند (Powell *et al.*,1996).

نتایج

بررسی چندشکلی در نمونه‌ها

در بررسی چندشکلی در این تحقیق از ۱۰ جفت آغازگر استفاده شد که در همه‌ی آنها چندشکلی مشاهده شد. با استفاده از این آغازگرها در مجموع ٤٠ باند نمره‌دهی شد که از این تعداد، ۳۰ باند چندشکلی نشان دادند. آغازگرهای ENOD20 و B21E13 با ۵ باند بیشترین و آغازگرهای AFct45 وMAL36947 هر کدام با ۳ باند کمترین تعداد باند را نشان دادند. آغازگر MAL369471 کمترین چندشکلی را نشان داد. درصد چندشکلی با میانگین ٧٣/٤ از ۳۳ درصد برای آغازگر MAL369471 (با کمترین درصد چندشکلی) تا ۱۰۰درصد برای آغازگر MTIC332 (با بیشترین درصد چندشکلی) متغیر بود (جدول ۳).

جدول ۳- آغازگرهای مورد استفاده در بررسی تنوع ژنتیکی ٣٤ توده یونجه زراعی

کد آغازگر	توالی آغازگر	تعداد کل باند	تعداد باندهای چندشکل	درصد چندشکلی	میزان اطلاعات چندشکلی (PIC)	شاخص نشانگر (MI)
MTIC345	۵'-tccgatcttgcgtcctaact-۳' ۳'-ccattgcggtggctactct-۵'	٤	۳	۷۵	۰/۷٤	۲/۲۲
B21E13	۵'-gccgatggtactaatgtagg-۳' ۳'-aaatcttgcttgcttctcag-۵'	۵	٤	۸۰	۰/۵۵	۲/۱۸
MTIC332	۵'-ccctgggtttttgatccag-۳' ۳'-ggtcatacgagctcctccat-۵'	٤	٤	۱۰۰	۰/۷۹	۳/۱۹
B14B03	۵'-gcttgttcttcttcaagctc-۳' ۳'-acctgacttgtgttttatgc-۵'	٤	۳	۷۵	۰/۵٤	۲/۱۷
MTIC432	۵'-tggaatttgggatataggaa-۳' left ۳'-ggccataagaacttccactt-۵'	٤	۳	۷۵	۰/٤۸	۱/۹۲
FMT13	۵'-gatgagaaaatgaaaagaac-۳' ۳'-caaaaactcactctaacacac-۵'	٤	۳	۷۵	۰/٤۷	۲/۸۰
AFct45	۵'-taaaaaacggaaagagttggttag-۳' ۳'- gccatcttttcttttgcttc-۵'	۳	۲	٦٦	۰/۳٤	۱/۳۹
MAL369471	۵'-attcacacaaacccatcttc-۳' ۳'-aaacccttagcaccgaca-۵'	۳	۱	۳۳	۰/۲۹	۰/۲۹
ENOD20	۵'-cgaacttcgaattaccaaagtct-۳' ۳'-ttgagtagcttttgggttgtc-۵'	۵	٤	۸۰	۰/۸۰	٤/۰۱
MTIC250	۵'-gcctgaactattgtgaatgg-۳' ۳'-cgttgatgatgttcttgatg-۵'	٤	۳	۷۵	۰/۵٤	۱/٦۲
میانگین		٤	۳	٧٣/٤	۰/۵۵	۲/۱

میانگین مقدار PIC در آغازگرها ۰/۵۵ محاسبه گردید که آغازگرهای ENOD20 و MTIC332 به‌ترتیب با ۰/۸ و ۰/۷۹ دارای بیشترین و آغازگرهای MAL369471 و AFct45 با مقادیر ۰/۲۹ و ۰/۳٤ به‌ترتیب کمترین مقدار PIC را داشتند، آغازگرهای ENOD و MTIC332 به‌ترتیب با ٤/۰۲ و ۳/۱۹ بیشترین میزان MI و آغازگرهای MAL369471 و AFct45 به‌ترتیب با ۰/۲۹ و ۱/۳۹ کمترین میزان MI را نشان دادند و میانگین MI در آغازگرها ۲/۱ محاسبه شد.

تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها

شاخص‌های Na، Ne، He و I برای هر استان محاسبه گردید (جدول٤). در استان‌های چهار محال و بختیاری وکرمانشاه به‌ترتیب با ۱/٥٦ و ۱/٥۱ بیشترین مقدار Na و در استان‌های آذربایجان‌شرقی و تهران کمترین مقدار Na (۱/۲٥) محاسبه شد. استان‌های تهران و آذربایجان‌غربی به‌ترتیب با ۱/۱٥ و۱/۲۲ کمترین مقدار Ne و استان‌های کرمانشاه، چهارمحال و بختیاری و توده‌های خارجی (ایتالیا، ترکیه و استرالیا) بیشترین مقدار Ne (۱/۳۲) را نشان دادند. استان چهارمحال و بختیاری با ۰/۱۹ و استان کرمانشاه و توده‌های خارجی با ۰/۱۸ و ۰/۱٦ به‌ترتیب بیشترین مقادیر He و استان‌های تهران و آذربایجان‌غربی به‌ترتیب با ۰/۰۸ و ۰/۱۳کمترین مقدار He را داشتند. استان‌های تهران و آذربایجان‌غربی به‌ترتیب با ۰/۱۳ و ۰/۲۰ کمترین مقدار I و استان چهارمحال و بختیاری و استان کرمانشاه به‌ترتیب با ۰/۲۹ و ۰/۲۷ بیشترین مقدار I را نشان دادند. توده‌های استرالیا، ترکیه و مرند- عریان تپه هر کدام با ۰/۲۱ و توده همدان-آب انبار با ۰/۲۰۸ به‌ترتیب بیشترین مقدار تنوع ژنتیکی (He) و توده‌های کرج (با کد دسترسی ٦٥-۱) و ورامین به‌ترتیب با ۰/۰٥۱ و ۰/۰٥۸ کمترین مقدار تنوع ژنتیکی (He) را داشتند. نتایج این تحقیق با یافته‌های محققان قبلی که بر روی یونجه‌های مناطق دیگر جهان انجام شده است تا حدود کمی مطابقت نشان داد (Li *et al.*, 2009).

با استفاده از شاخص‌های ذکر شده در بالا گزارشی از تنوع ژنتیکی برای یونجه‌های داخل کشور وجود ندارد اما از شاخص محتوی اطلاعات چندشکلی یا شاخص تنوع (PIC) برای بیان میزان تنوع ژنتیکی ٦ جمعیت یونجه ایرانی استفاده کرده‌اند و ضریب تنوع (PIC) را ۰/٦۲ تا ۰/۸۷ گزارش کرده‌اند (Bahar *et al.*, 2007). در تحقیق حاضر شاخص محتوی اطلاعات چندشکلی ۰/۲۹ تا ۰/۸۰ بدست آمد.

روابط ژنتیکی جمعیت‌ها

بررسی روابط ژنتیکی بین نمونه‌ها با استفاده از ماتریس تشابه دایس و فاصله ژنتیکی نی به صورت دو به دو و جفتی بین جمعیت‌ها انجام شد و دندروگرام مربوطه رسم گردید (شکل ۱). بر این اساس، توده‌ها به دو گروه اصلی تقسیم شدند که یک گروه مربوط به دو توده‌ی شهرستان کرج و گروه دیگر مربوط به سایر توده‌ها بود. متمایز بودن توده‌های کرج از بقیه‌ی توده‌ها تمایز ژنتیکی آنها را با سایر توده‌های مطالعه شده نشان داد که احتمالا در اثر عدم اختلاط یا عدم نقل و انتقالات جغرافیایی آنها با توده‌های دیگر در دوره‌های زمانی طولانی است. بنابراین، نتایج نشان می‌دهد که در توده‌های یونجه زراعی تنوع ژنتیکی با پراکنش جغرافیایی تطابق کامل ندارند. نتایج مشابهی نیز در مطالعه تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیتی یونجه‌های زراعی به‌وسیله فلاحتی و همکاران (۲۰۰۷) حاصل شد. در مطالعه آنها نیز توده‌های یونجه به دو گروه تقسیم شدند (Falahati *et al.*, 2007).

جدول ٤- تنوع ژنتیکی مشاهده شده توده‌های یونجه براساس محل جمع‌آوری

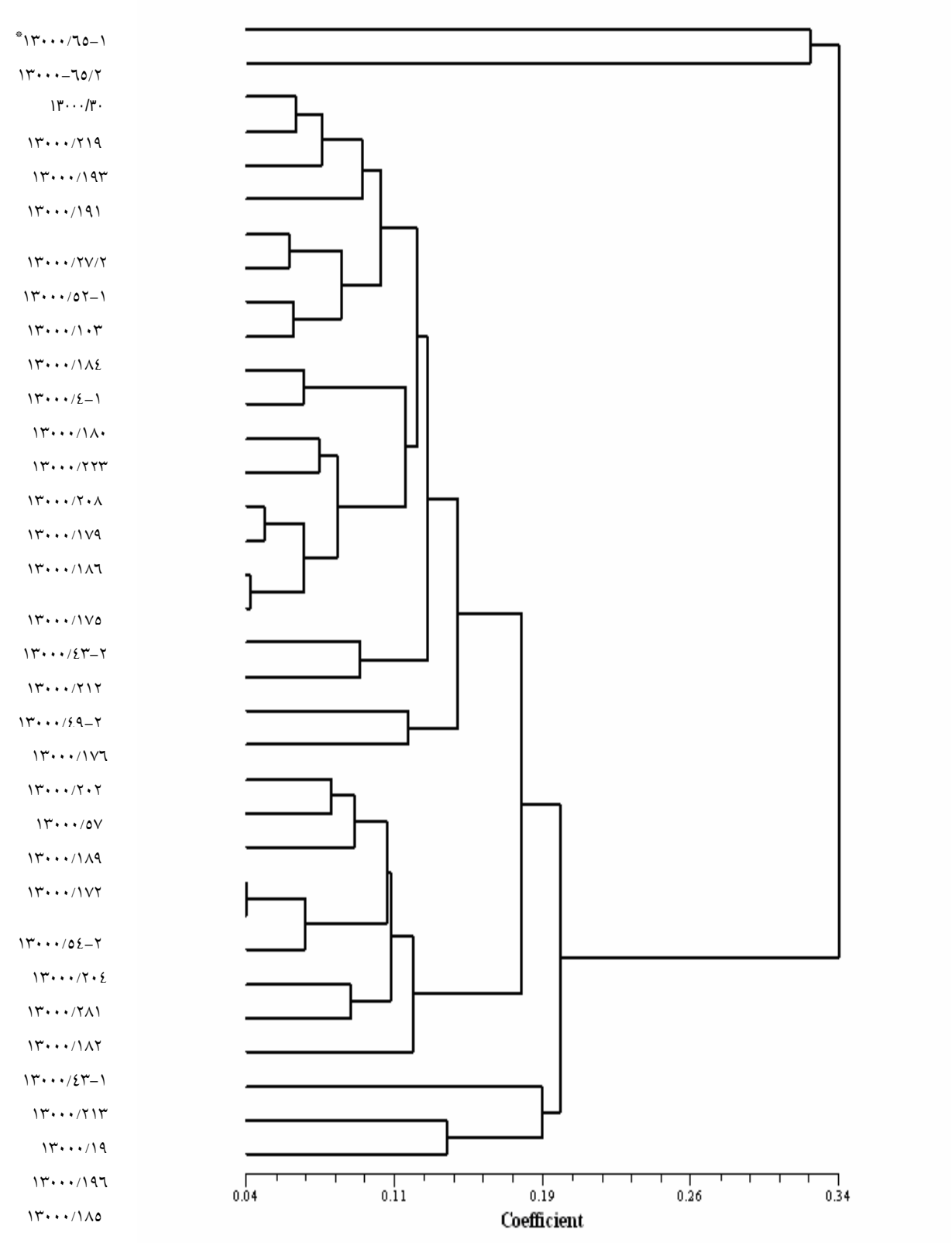
نام استان	تعداد نمونه	Na(st.d)	Ne(st.d)	He (st.d)	I(st.d)
آذربایجان‌غربی	۱	۱/۳۹(۰/٤۹)	۱/۲۲(۰/۳۳)	۰/۱۳(۰/۱۸)	۰/۲۰(۰/۲٦)
آذربایجان‌شرقی	٥	۱/۲٥(۰/٥)	۱/۳۰(۰,۳۷)	۰/۱۷(۰/۲۰)	۰/۲۳(۰/۲۹)
کردستان	۱	۱/٤۳(۰/٥)	۱/۲۷(۰/۳۷)	۰/۱٥(۰/۲)	۰/۲۳(۰/۲۸)
کرمانشاه	۱	۱/٥۱(۰/٥)	۱/۳۲(۰/۳۸)	۰/۱۸(۰,۲)	۰/۲۷(۰,۲۹)
چهارمحال و بختیاری	۱	۱/٥٦(۰/٥)	۱/۳۲(۰/۳۷)	۰/۱۹٥(۰/۱۹)	۰/۲۹(۰/۲۸)
سمنان	۳	۱/٤٤(۰/۳۸)	۱/۲۸(۰/۳۷)	۰/۱٦(۰/۲۰)	۰/۲٤(۰/۲۸)
تهران	۳	۱/۲٥۷۸(۰/۳۸)	۱/۱٥۰۱(۰/۲۸)	۰/۸۸۰٦(۰/۱٥)	۰/۱۳۲۹(۰/۲۳)
همدان	۱٦	۱/٤۳٦۹(۰/٤۸)	۱/۲۷۹۸(۰/۳۷)	۰/۱٦۱۱(۰,۱۹)	۰/۲۳۹۳(۲)
ایتالیا	۱	۱/۳٤(۰/٤۸)	۱/۲(۰/۳۳)	۰/۱۲(۰/۱۸)	۰/۱۸(۰/۲٦)
ترکیه	۱	۱/٥٤(۰/٥۰)	۱/۳۹(۰/٤۳)	۰/۲۱(۰/۲۲)	۰/۳۰(۰/۳۱)
استرالیا	۱	۱/٥۲(٥۰)	۱/۳۸(۰/٤۱)	۰/۲۱(۰/۲۱)	./۳۰(۰/۳۱)

Na= تعداد آلل مشاهده شده، Ne= تعداد آلل‌های مؤثر، H= تنوع ژنتیکی نی، I= شاخص اطلاعات شانون

بحث

نتایج PIC نشان می‌دهد که دو آغازگر ENOD و MTIC332 با بیشترین مقدار PIC قادر به شناسایی بهتر فاصله ژنتیکی توده‌ها بودند همچنین نتایج MI نشان می‌دهد که به‌ترتیب آغازگرهای ENOD و MTIC332 بیشترین پتانسیل را در تولید باند داشتند (Powell *et al.*, 1996) (جدول۳). متمایز بودن توده‌های کرج از بقیه‌ی توده‌ها تمایز ژنتیکی آنها را با سایر توده‌های مطالعه شده نشان می دهد (شکل ۱) که احتمالا در اثر عدم اختلاط یا عدم نقل و انتقالات جغرافیایی آنها با توده‌های دیگر در دوره‌های زمانی طولانی است. بنابراین، نتایج نشان می‌دهد که در توده‌های یونجه زراعی تنوع ژنتیکی با پراکنش جغرافیایی تطابق کاملی ندارند. نتایج مشابهی نیز در مطالعه تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیتی یونجه‌های زراعی به‌وسیله فلاحتی و همکاران (۲۰۰۷) حاصل شد، در مطالعه آنها نیز توده‌های یونجه به دو گروه تقسم شدند (Falahati *et al.*, 2007).

حداکثر تنوع ژنی برای استان چهار محال و بختیاری محاسبه گردید. وجود تنوع ژنی بیشتر در این استان ممکن است به دلیل دگرگشن بودن این گیاه و گرده‌افشانی آن به وسیله زنبور عسل (که به علت شرایط آب و هوای مساعد پرورش آن رونق فراوانی دارد) در کنار سایر عوامل ایجاد کننده تنوع ژنی باشد. همدان در بین شهرهای کشور بیشترین سطح زیرکشت یونجه را دارد و در این تحقیق نیز از این استان ۱٦ توده انتخاب شد. در تقسیم‌بندی زیرگروه‌ها نیز سه توده همدان (با کد دسترسی۱۹٦)، همدان- کرج (با کد دسترسی ۱۸٥) و همدان ایتالیا (با کد دسترسی ۱۷٥) از این استان در یک زیرگروه و دوتوده‌ی همدان-قریه فامین‌چه (با کد دسترسی٤۰) و همدان اصفهان با کد دسترسی (۱۸۰) در زیرگروه دیگر قرار



شکل ۱- دندروگرام حاصل شده براساس الگوریتم UPGMA وضریب تشابه دایس.

* اعداد مربوط به کد دسترسی توده‌ها است که در جدول-۱ آورده شده‌اند.

گرفتند که قرارگیری آنها در یک زیرگروه به علت شباهت ژنتیکی این توده‌ها می‌باشد. ۱۱ توده دیگر استان همدان در سایر زیرگروه‌ها قرار گرفتند که این موضوع بیانگر تنوع بالای ژنتیکی در استان همدان می‌باشد. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که در بسیاری از موارد تنوع ژنتیکی توده‌های یونجه زراعی متاثر از پراکنش جغرافیایی نیست و نشانگرهای ریزماهواره ابزار مؤثری در ارزیابی تنوع ژنتیکی یونجه در مکان‌های جغرافیایی مختلف است همچنین مناطقی از کشور که تنوع ژنتیکی بیشتری برای آنها مشاهده شده است باید به‌عنوان مناطقی برای نمونه‌گیری بیشتر به منظور حفظ ژرم پلاسم مورد توجه قرار گیرند.

منابع مورد استفاده:

– Anderson, J.A., Church, J.E., Autrique, S.D., Thanksley, S. and Sorrells, M.E., 1993. Optimizing parental selection for genetic linkage map. Journal of Genome, 36(1): 181-188.

– Bahar, M., Ghobadi, S., Arfani Moghadam, V., Yamchi, A., Talebi Badaf, M., Kaboli, M. and Mokhtar zadeh, A., 2007. Evaluation of genetic diversity of *Medicago sativa* of Iran using ESTs microsatellite markers, Journal of science and technology of Agricultural and Natural Resource, 10(2): 141-153.

– Bassam, B., Caetano-Anolles, J.G. and Gressho, P. M., 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Journal of Analytical biochemistry, 196(1): 80-83.

– Bonnin, I. and Ronfort, J., 2001. Spatial effect and rare outcrossing events in *M. truncatula* (Fabaceae). Journal of Molecular Ecology, 10(6): 1371-1384.

– Brummer, E.C., Kochert, G. and Bouton, J. H., 1991. RFLP variation in diploid and tetraploid alfalfa. Journal of Theoritical and Applied Genetics, 83(1): 89-86.

– Diwan, N., Bouton, J.H., Kochert, G. and Cregan, P.B., 2000. Mapping simple sequence repeats (SSR) DNA markers in diploid and tetraploid alfalfa. Journal of Theoritical and Applied Genetics. 101(1-2): 165-172.

– Echt, C.S., Kidwell, K.K., Knapp, S.J., Osborn, T.C. and McCoy, M.J., 1994. Linkage mapping in diploid alfalfa (*Medicago sativa*). Journal of Genome, 37(1): 61-71.

– 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 centres of origin of the species, Journal of genetic, 86(1): 59-63.

– Fareghi, S.H., Farshadfar, M. and Farshadfar, E., 2007. Study of chemical composition and nutrition value of prennial Lucerne (*Medicago sativa* L.) and genetic diversity based on SDS-PAGE markers, Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 15(3): 196-210.

– Jafari, A. and Goodarzi, A., 2007. Genetic variation for yield and its relationships with quality and agronomic traits in 72 accessions of alfalfa (*Medicago sativa* L.**),** Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 14(4): 215-229.

– Kalo, P., Endre, G., Zimanyi, L., Sandi,G.C. and Kiss,G.B., 2000. Construction of an improved linkage map of diploid alfalfa (*M. sativa*). Journal of Theoritical and Applied Genetics, 100(5): 641-657.

– Kashi, Y., King, D. and Soller, M., 1997. Simple sequence repeats as a source of a quantitative genetic variation. Journal of Trends in Genetics, 13(1): 74-78

– Li, Y., Wng, Y., Sun, X. and Han, J., 2009. Using microsatellite (SSR) and morphological markers to assess the genetic diversity of 12 falcata (*Medicago sativa* spp. *falcata*) populations from Eurasia. Biotechnology, 8 (10): 2102-2108.

– Lit, M. and Luty, J.A., 1989. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the caradiac muscle actine gene. American Journal of Human Genetic, 44(3): 397-401.

– Mengoni, A. Gori, A. and Bazzicalupo, M., 2000. Use of RAPD and microsatellite (SSR) variation to assess geneticrelationships among populations of tetraploid alfalfa (*Medicago sativa).* Journal of Plant Breeding, 119(4): 311-317.

– Musial, J.M., Basford, K.E. and Girwin, J.A., 2002. Analysis of genetic diversity within Australian Lucerene cultivars and implication for future genetic improvement. Australian Journal of Agricultural Research, 53(6): 629-636.

– Powell, W., Morgante, M., Ander, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingy, S., Rafalaski, A., 1996. The comparision of RFLP, RAPD, AFLP and SSR(microsatellite) marker for germplasm analysis. Journal of Molecular Breeding, 2(3): 225-238.

– Saghai-Maroof, M.A., Soliman, K., Jorgensen, R.A. and Allard, R.W., 1984. Ribosomal DNA spacer-

length polymorphism in barely: mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics, Journal of PNAS, 81(4): 8014-8018.
– Sauer, J.D., 1993. Historical Geography of Crop Plants - A Select Roster. CRC Press, Florida, 540 p.
– Sharma, K.K., Crouch, J.H. and Hash, C.T., 2002. Application of biotechnology for crop improvement: prospect and constraints. Journal of Plant Scicence, 163(3): 381- 395.
– Singhet, R.P., Villareal, R.L., Rajaram, S. and Del Toro, E., 1989. Cataloguing dwarfing genes Rht1 and Rht2 in germplasm used by the Bread Wheat Breeding Program at CIMMYT. Journal of Cereal Research Communication, 17(1): 273-279.
– Tucak, M., Popovic, S., Grljusic, S., Bolaric, S. and Kozumplic,V., 2008. Genetic diversity of alfalfa (*Medicago* spp.) estimated by molecular markers and morphological characters. Journal of Periodicum Biologorum, 110(3): 243–249.

Investigation of genetic diversity of some *Medicago sativa* from west and northwestern of Iran using microsatellite markers

R. Mohammadi[1]*, A.R. Maali[2], M.R. Naghavi[3], M.M. Kaboli[4]

1*- Corresponding author, M.Sc., Agriculture and Natural Recourses Campus, Tehran University, Karaj, I.R.Iran, E-Mail: rm1387@gmail.com
2- Assis. Prof., Agriculture and Natural Recourses Campus - Tehran University, Karaj, I.R.Iran
3- Assoc. Prof., Agriculture and Natural Recourses Campus- Tehran University, Karaj, I.R.Iran
4- M.Sc. Jahad-Agriculture Ministry, Tehran, I.R.Iran.

Received: 06.11.2008 Accepted: 22.11.2009

Abstract

Alfalfa is one of the most important forage crops in the world. The west and northwest parts of Iran are the important regions for Alfalfa planting. Because few studies are available on the genetic diversity of this crop in the regions, therefore, the objective of this study was to determine the genetic diversity in 34 populations of alfalfa from west and northwest of Iran. These were analyzed using 10 microsatellite markers. Totally, 51 bands were obtained from which 45 bands were polymorphic corresponding to an average of 5 alleles per locus. The percentage of polymorphism with an average of 0.55 varied from 0.29 for MAL369471 to \0.8 for ENOD20 and also for MI with an average of 2.1 from 0.29 for MAL369471 to 4.01 for ENOD20. Chaharmahal va Bakhtiari province had maximum of both gene diversity and Shannon's Information index (He=0.19, I=0.29), while the minimum amounts (He=0.13, I=0.13) were obtained in Tehran province. Dendrogram constructed based on dissimilarity matrix grouped populations in two main groups; the first group belongs to populations from Karaj, while in the other populations were located in second group. The result showed that microsatellite markers are effective tools for evaluation genetic diversity in Iranian alfalfa populations. The results of this study provided useful information for the future collection and for the of genetic resource management in the regions.

Key words: Genetic diversity, *Medicago sativa*, SSR.