ارزیابی تنوع ژنتیکی بین و درون اکوتیپ‌های یونجه (*Medicago sativa* L.) با نشانگرهای RAPD

Genetic Diversity Among and Within of Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Ecotypes Based on RAPD Markers

حسن منیری‌فر[1*]، احمد رزبان[2]، مصطفی ولی‌زاده[3]، جلال صبا[4]، شهین نوع پرور[5]، فاطمه محمدزاده[6] و مریم برقی[7]

چکیده

در این بررسی تنوع ژنتیکی در 30 اکوتیپ یونجه ایرانی جمع‌آوری شده از منطقه شمال‌غرب کشور با استفاده از نشانگرهای RAPD ارزیابی شد. استخراج DNA در 30 نمونه از هر اکوتیپ انجام شد. ده آغازگر از 30 آغازگر تصادفی ارزیابی شده، مجموعاً 78 نوار چند شکل ایجاد کردند و تعداد نوارهای چند شکل از 36 نوار تا 68 نوار متفاوت بود. بیشترین میانگین سطح تنوع ژنتیکی براساس شاخص‌های نی و شانون در اکوتیپ ورزقان - جوشین مشاهده شد و کمترین آن متعلق به اکوتیپ تبریز- اسپره‌خون بود. بیشترین فاصله ژنتیکی F_{ST} بین اکوتیپ‌های مرند- زنوزق و بستان‌آباد- باش‌کند و کمترین آن مربوط به اکوتیپ‌های ورزقان- جوشین و ورزقان – الهرد بود که این نتایج با فواصل جغرافیایی مناطق مورد کشت اکوتیپ‌های فوق مطابقت نشان داد. تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که 34/63 درصد از تنوع کل مربوط به تنوع ژنتیکی بین اکوتیپ‌ها و 65/37 درصد مربوط به تنوع ژنتیکی درون اکوتیپ‌ها می‌باشد که حاکی از تنوع قابل ملاحظه و وجود پتانسیل عظیم ژنتیکی برای کارهای اصلاحی آتی می‌باشد. تجزیه خوشه‌ای 30 اکوتیپ یونجه را در 4 خوشه دسته‌بندی نمود. اکوتیپ بستان‌آباد- باش کند به صورت انفرادی در یک گروه مستقل قرار گرفت. این اکوتیپ از نظر ویژگی‌های اقلیمی منطقه مورد کشت نیز متفاوت از سایراکوتیپ‌ها بود به‌طوری‌که ارتفاع منطقه جمع‌آوری2400 متر و در اقلیم بسیار سرد واقع شده است و جزو اکوتیپ‌های متحمل به سرما می‌باشد. به نظر می‌رسد ارتفاع ناحیه جغرافیایی اکوتیپ‌ها دارای بیشترین سهم در تاثیرگذاری برروی ساختار ژنتیکی آن‌ها بوده است.

واژه‌های کلیدی: یونجه، تنوع ژنتیکی، نشانگرهای RAPD، واریانس مولکولی

Archive of SID

1. استادیار پژوهش مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان شرقی، تبریز
2. کارشناس محقق مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان‌شرقی، تبریز
3. استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز
4. استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان
5. دانش آموخته کارشناسی ارشد اصلاح نیاتات دانشگاه تبریز
6. دانش آموخته کارشناسی ارشد اصلاح نیاتات دانشگاه زنجان
7. دانش آموخته کارشناسی ارشد اصلاح نیاتات دانشگاه زابل
*: نویسنده مسئول

www.SID.ir

مقدمه

یونجه (*Medicago sativa* L.) یکی از مهم‌ترین گیاهان علوفه‌ای است و اهمیت زیادی در تغذیه دام‌ها و افزایش فراورده‌های دامی دارد. این گیاه که اغلب به‌عنوان ملکه نباتات علوفه‌ای نامیده می‌شود از مهم‌ترین گیاهان علوفه‌ای دنیا به‌شمار می‌رود (Tucak *et al*., 2008). در این که ایران ناحیه مرکزی خاستگاه جغرافیایی یونجه است، توافق کلی وجود دارد ولی اهمیت و وفور آن در منطقه شمالغرب کشور متمایز از سایر مناطق می‌باشد. بنابراین ژرم پلاسمی بسیار غنی از این گیاه در منطقه وجود دارد (Monirifar & Barghi 2009).

آگاهی از سطح تنوع ژنتیکی و برآورد دقیق آن در ژرم‌پلاسم‌های گیاهی و تعیین روابط ژنتیکی بین مواد اصلاحی، پایه و اساس بسیاری از برنامه‌های اصلاحی است. اهمیت تنوع ژنتیکی در گیاهان از دو دیدگاه مورد توجه است: نخست تنوع ژنتیکی شرط لازم برای رسیدن به محصول بیشتر و پایداری عملکرد است. از سوی دیگر تنوع ژنتیکی، منابع ژنتیکی مفید برای برنامه‌های اصلاحی را شناسایی کرده و باعث حفظ آن‌ها می‌شود (Gepts & Papa 2003)، به همین دلیل اصلاح‌گران در جستجوی منابع جدید ژنتیکی و روش‌های استفاده از آن‌ها به‌منظور افزایش و پایداری عملکرد در مواجهه با تنش‌های جدید هستند. به نژادگران برای این‌که بتوانند ارقام جدیدی از گیاهان زراعی را معرفی کنند، نیازمند دسترسی به ژرم پلاسم‌های فراوانی هستند که یا از بین رفته‌اند و یا در حال از بین رفتن هستند. بنابراین اطلاع از میزان تنوع ژنتیکی، بهره‌برداری صحیح و دقیق و حفاظت از منابع ژنتیکی در پیشبرد برنامه‌های به نژادی و مطالعه‌ی روند تکامل گیاهان زراعی در جهت تبیین اصول صحیح برنامه ریزی‌های به نژادی حایز اهمیت است (Ford-Lloyd 2001).

گزارش‌های متعددی مبنی بر استفاده از نشانگرهای RAPD برای برآورد تنوع ژنتیکی وجود دارد. *گراردی* و همکاران (Gerardi *et al*., 1997) با استفاده از پنج آغازگر RAPD فاصله ژنتیکی بین 8 رقم یونجه اصلاح شده و نشده را بررسی و گزارش نمودند که در بیشتر مکان‌های ژنی چند شکلی بالایی وجود دارد. آن‌ها تنوع ژنتیکی بین و درون جمعیت را محاسبه و اذعان نمودند که بین جمعیت‌ها به‌طور قابل ملاحظه‌ای، این تنوع معنی‌دار است.

کروچمور و همکاران (Crochemor *et al*., 1996) با استفاده از نشانگرهای RAPD توانستند 26 جمعیت یونجه تتراپلویید را گروه‌بندی نمایند. آن‌ها نشان دادند که تنوع ژنتیکی تقریباً در حد مساوی بین و درون جمعیت قابل توزیع است و از تحقیقات خویش نتیجه گرفتند که چنین روشی برای تشخیص واریته‌ها می‌تواند موثر باشد. *دهقان‌شعار* و همکاران (Dehghan Shoar *et al*., 1997) نیز با استفاده از نشانگرهای RAPD اقدام به تجزیه ژنتیکی بین و درون جمعیت‌های یونجه کردند. مواد آزمایشی آن‌ها شامل 6 رقم ایرانی، 2 رقم نیوزلندی و 2 رقم آمریکایی بود. از هر رقم 40 گیاه مورد بررسی قرار گرفت و نشان دادند که بین ارقام و بخصوص ارقام ایرانی، تنوع وسیعی وجود دارد. آن‌ها پیشنهاد کردند که تجزیه ژنتیکی جمعیت‌ها در یونجه با استفاده از نشانگرهای RAPD می‌تواند برای اصلاح ارقام و هم‌چنین در برنامه‌های کنترل و گواهی بذر و ارزیابی خلوص آن‌ها مورد استفاده قرار گیرد.

جنزوفسکی و همکاران (Jenczewski *et al*., 1992) برای تشخیص تفاوت بین ارقام اصلاح شده و نشده یونجه اسپانیایی از نشانگرهای RAPD استفاده کردند و نتایج را با بررسی آلوزیم مقایسه و اظهار نمودند که اگرچه نشانگرهای RAPD در داخل ارقام فاصله ژنتیکی کمتری نسبت به آلوزیم نشان داد ولی کیفیت و کمیت الگوی باندی ارقام کاملاً با آلوزیم یکسان بود.

موسیال و همکاران (Musial *et al*., 2000) از نشانگرهای RAPD در تجزیه فاصله ژنتیکی درون ارقام یونجه استرالیایی استفاده کردند و اظهار داشتند که وجود فاصله ژنتیکی در درون جمعیت‌های یونجه تشخیص فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌های یونجه را مشکل می‌سازد. آن‌ها ارقام یونجه منتخب از گونه‌های *Medicago falcata* و *Medicago sativa* را در استرالیا مورد بررسی قرار دادند. از هر ده کولتیوار 19 گیاه مورد تجزیه قرار گرفت و با استفاده از 11 آغازگر RAPD، 96 باند پلی‌مورفیک ثبت شد و شباهت ژنتیکی بین ارقام و درون آن‌ها اندازه‌گیری شد که درون ارقام شباهت ژنتیکی از 0/43 تا 0/51 و بین ارقام از 0/31 تا 0/49 بود. بنابراین جدا کردن ارقام از یک‌دیگر میسر نگردید و هم‌چنین اظهار داشتند که وجود فاصله ژنتیکی زیاد در بین و درون ارقام برای ارقام سنتتیک خیلی مهم می‌باشد.

کازکارو (Cazcarro 2000) 50 نمونه جمع آوری شده مربوط به گونه‌های *M. sativa* و *M. falcata* از آسیا و اروپا را مورد بررسی قرار دادند. گروه‌بندی نمونه‌ها بر اساس نتایج حاصل از نشانگرهای RAPD و AFLP نشان داد که بین صفات مرفولوژیکی و تنوع ژنتیکی رابطه مستقیمی وجود

www.SID.ir

دارد که بر اساس آن دو کلاستر مشخص گردید. این نتایج مشابه نتایج مربوط به تحقیقات بیر و همکاران (Beer *et al*, 1993) بود که در یولاف روی صفات مرفولوژیکی و تنوع ژنتیکی کار کرده بود و نتایج مشابهی حاصل شده بود. *توکاک* و همکاران (Tucak *et al.*, 2008) تنوع ژنتیکی را از طریق نشانگر RAPD در 14 رقم یونجه *M. sativa* به همراه یک جمعیت از *M. falcata* مورد بررسی قرار دادند و براساس نتایج حاصله پیشنهاد نمودند که نشانگرهای RAPD می‌توانند ابزار مفید و توانمند برای برآورد تنوع ژنتیکی در ژرم‌پلاسم متنوع یونجه باشند. هم‌چنین *جانسون* و همکاران (Johnson *et al.*, 2002) برای تشخیص سطوح مقاومت در گیاه یونجه و جمعیت های آن آزمایشاتی با PCR انجام دادند.

کیشا و همکاران (Kisha *et al.*, 2002) در اندازه‌گیری تنوع ژنتیکی در بین یونجه‌های ترکیه، استرالیا و اسپانیا به‌وسیله نشانگرهای متفاوت، ابراز داشتند که نشانگرهای مولکولی به‌طور وسیعی برای اندازه‌گیری تنوع ژنتیکی استفاده می‌شود ولی درستی و صحت اطلاعاتی که از این نشانگرها به دست می‌آید اغلب ناشناخته است و انتخاب نشانگرها یا بر اساس هزینه کم آن و یا بر اساس امکانات آزمایشگاه صورت می‌پذیرد. آن‌ها برای آزمایش کارایی نشانگرها در اندازه‌گیری تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های سنتتیک از 96 گیاه از سه جمعیت یاد شده استفاده کردند و نشانگرهای SSR و RAPD را به‌کار بردند و نتیجه گرفتند که واریانس ژنتیکی با هر کدام از نشانگرها همبستگی دارد و می‌توان از هر کدام از نشانگرها در تعیین فاصله ژنتیکی استفاده کرد.

این پژوهش به‌منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی درون و بین30 اکوتیپ یونجه مناطق مختلف آذربایجان و هم‌چنین گروه‌بندی آن‌ها با استفاده از نشانگرهای RAPD، جهت استفاده در برنامه‌های اصلاحی و تولید واریته‌های پر محصول انجام شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: مواد گیاهی شامل 29 توده محلی جمع‌آوری شده از مناطق مختلف استان آذربایجان‌شرقی و یک رقم اصلاح شده بود. توده‌های محلی با مراجعه حضوری به مناطق مورد کشت یونجه و کسب اطمینان از محلی بودن بذور جمع‌آوری شد. لیست اکوتیپ‌های مورد استفاده به همراه مشخصات مربوطه در جدول یک ذکر شده است.

استخراج DNA

از هر اکوتیپ 30 بذر انتخاب شد و استخراج DNA از هر تک بذر و با روش کانک و یانگ (Kang & Yang 2004) با بعضی از تغییرات به شرح زیر انجام شد:

1- هر بذر در هاون به همراه 200 میکرولیتر از بافر استخراج که قبلاً در انکوباتور در 60 درجهٔ سانتی‌گراد گرم شده بود، کاملاً له شده و تمام مواد داخل هاون به یک تیوب منتقل شد.
2- تیوب‌ها در دستگاه سانتریوفوژ در 10000 دور در دقیقه (rpm) به مدت 5 دقیقه سانتریوفوژ شدند.
3- مایع فوقانی (سوپرناتانت) هر تیوب به تیوب دیگری منتقل شده و هم حجم آن ایزوپروپانول به آن‌ها اضافه شد.
4- تیوب‌ها چند بار به آرامی وارونه شده و در این مرحله، کلاف کاملاً شفاف و سفید رنگی که حاوی DNA بود، در هر تیوب مشاهده گردید.
5- پس از آن تیوب‌ها به مدت 5 دقیقه در 5000 دور دقیقه سانتریوفوژ شدند.
6- مایع فوقانی هر تیوب دور ریخته شد. رسوب تشکیل شده در ته تیوب (پلیت) DNA است.
7- تیوب‌ها به‌طور وارونه گذاشته شدند تا الکل درون آن‌ها کاملاً خشک و برطرف شود.
8- در نهایت به هر تیوب، 50 میکرولیتر بافر TE اضافه شده، تیوب‌ها در دمای اتاق به مدت چند ساعت قرار داده شدند.

RNA بعد از مدتی حذف می‌شود، بنابراین از RNase استفاده نشد.

کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگاروز و روش اسپکتروفتومتری بررسی شد.

انجام PCR، بارگذاری و امتیازدهی نوارها

جدول 2 مشخصات آغازگرهای تصادفی مورد استفاده را نشان می‌دهد. آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش، از شرکت سیناژن به‌صورت محلول منجمد تهیه و در فریزر 20- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. 38 آغازگر تصادفی با استفاده از 5 نمونه تصادفی از بین تمام نمونه‌ها، مورد بررسی قرار گرفتند. این بررسی با غلظت رقیق نشده و غلظت‌های مختلف رقیق شده به‌وسیله آب استریل دوبار تقطیر شده انجام شد و در نهایت 10 آغازگر با الگوی نواری مناسب برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز انتخاب شدند. ابتدا برنامه PCR به‌منظور به‌دست آوردن دمای مناسب بازسرشتی برای

Archive of SID
www.SID.ir

آغازگرهای مورد استفاده، با چند نمونه DNA، در دماهای مختلف بازسرشتی و اتصال بهینه شده و برنامه PCR تنظیم شد. مراحل واسرشته‌سازی، اتصال آغازگر و بسط، 40 بار تکرار شد و پس از پایان PCR، محصولات PCR، در فریزر 20- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند تا الکتروفورز شوند. جداسازی محصولات تکثیرشده PCR با استفاده از ژل آگارز 1/5 درصد انجام و به روش رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید آشکارسازی شدند. برای تهیه ژل، بر روی آگارز بافر TAE(1x) اضافه و تا حل شدن کامل جوشانده شد. پس از رسیدن دمای ژل به حدود 50 درجه سلسیوس، مقدار 5 میکرولیتر محلول 10 میلی‌گرم در میلی‌لیتر اتیدیوم بروماید، به ازای 300 میلی‌لیتر ژل اضافه و پس از خنک شدن، ژل در قالب مربوطه ریخته شد.

به هر تیوپ PCR واکنش RAPD، 2 میکرولیتر بافر بارگذاری اضافه و از هر نمونه 10 میکرولیتر در هر چاهک بارگذاری شد. ولتاژ مورد نظر برای عمل الکتروفورز 90 ولت و مدت زمان الکتروفورز 3/5 ساعت در نظر گرفته شد.

الگوی نواری حاصل مورد بررسی قرار گرفت و برای نوارهای واضح و بدون ابهام با مقادیر صفر و یک (عدم وجود و وجود باند) امتیازدهی به‌عمل آمد و هم‌چنین برای مشخص شدن اندازه قطعات تکثیر شده از نشانگر وزن مولکولی با اندازه قطعات 3000-100 جفت باز استفاده شد.

جدول 1: نام و محل جمع‌آوری اکوتیپ‌های مورد مطالعه در ارزیابی تنوع ژنتیکی بین و درون اکوتیپ‌های یونجه ایرانی با نشانگرهای RAPD

Table 1: Names and collection sites of 30 alfalfa ecotypes used for genetic diversity study based on RAPD

	Ecotype name	نام اکوتیپ	Collection site	محل جمع آوری
1	Marzad	مارزاد	Jolfa	جلفا
2	Gran chay	قران‌چای	Kaleibar	کلیبر
3	Leghan	لقلان	Ahar	اهر
4	Zonorag	زنورق	Marand	مرند
5	Sivan	سیوان	Marand	مرند
6	Khor-khor	خورخور	Oskou	اسکو
7	Sattelou	ساتلو	Tabriz	تبریز
8	Smail-abad	اسماعیل‌آباد	Malekan	ملکان
9	Koul-tapa	کل تپه	Maraghe	مراغه
10	Almalou	آلمالو	Ajab-Shir	عجب‌شیر
11	Kordadeh	کرده‌ده	Maraghe	مراغه
12	Sefidkhan	سفیده‌خان	Tabriz	تبریز
13	Gara-baba	قره‌بابا	Bostan-Abad	بستان‌آباد
14	Zolbin	ذوالبین	Hasht-Roud	هشترود
15	Zavie	زاویه	Hasht-Roud	هشترود
16	Seiviar	سیویار	Hasht-Roud	هشترود
17	Akram-abad	اکرم آباد	Hasht-Roud	هشترود
18	Balsin	بالسین	Miyane	میانه
19	Bash-kand	باش‌کند	Bostan-Abad	بستان‌آباد
20	Ein-aldin	عین‌الدین	Bostan-Abad	بستان‌آباد
21	Baftan	بافتان	Sarab	سراب
22	Ilan-jough	ایلان‌جوق	Ardabil	اردبیل
23	Khaje	خواجه	Heris	هریس
24	Goravan	گوراوان	Heris	هریس
25	Dizaj-safarali	دیزج‌صفرعلی	Varzgan	ورزقان
26	Kordlou	کردلر	Ahar	اهر
27	Khosrovanagh	خسروانق	Varzgan	ورزقان
28	Chalnab	چلناب	Varzgan	ورزقان
29	Almard	المرد	Varzgan	ورزقان
30	Gara-yonjeh	قره‌یونجه	Khosro-Shahr	خسروشهر

Archive of SID
www.SID.ir

جدول 2: آغازگرهای مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای تجزیه RAPD
Table 2: Description of arbitrary oligonucleotide primers used for RAPD analysis

نام آغازگر Primer	توالی Sequence	تعداد نوار چند شکل Number of bands	اندازه باند Band size range
OPJ4	CCGAACACGG	5	550-1250
B1	GGTTCGCTCC	7	350-900
B6	TGCTCTGCCC	10	230-1400
B7	GGTGACGCAG	11	250-1500
B8	GTCCACACGG	8	270-1100
OPJ13	CCACACTACC	9	220-1200
B10	CTGCTGGGAC	10	370-3000
OPA1	CAGGCCCTTC	6	300-1600
OPJ19	GGACACCACT	6	300-1100
OPJ20	AAGCGGCCTC	8	200-1250

تجزیه‌های آماری

پس از امتیازدهی باندها، جدول دو طرفه‌ی ماتریس نوار و اکوتیپ تهیه و داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای آماری POPGENE، NTSYS-pc، ARLEQUIN(ver3) تجزیه و تحلیل شدند و تعداد کل نوارهای چند شکل، تنوع ژنتیکی کل (Ht) و درون اکوتیپ‌ها (Hs) و درجهٔ تمایز ژنی بین آن‌ها برآورد شد. هم‌چنین فاصله‌ی ژنتیکی بین اکوتیپ‌ها محاسبه شده، تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) برای تفکیک واریانس کل مولکولی به واریانس بین و درون اکوتیپ‌ها به‌عمل آمد (Huff 1997) و ژنوتیپ‌ها با استفاده از روش تجزیه خوشه‌ای گروه‌بندی شدند و دندروگرام به روش UPGMA رسم شد.

نتایج و بحث

چندشکلی نشانگرهای RAPD در اکوتیپ‌های مورد مطالعه

از 30 آغازگر تصادفی ارزیابی شده، تعداد ده آغازگر با الگوی نواربندی مناسب و چند شکل برای مطالعه اکوتیپ‌ها استفاده شدند و ده پرایمر مورد استفاده مجموعاً 78 نوار چندشکل ایجاد کردند که در محدوده 150 تا 2700 جفت باز قرار داشتند. تعداد کل نوارهای چندشکل درون اکوتیپ‌ها از 36 نوار در اکوتیپ شماره 12(تبریز-اسپره خون) تا 68 نوار در اکوتیپ 27 (ورزقان-جوشین) متفاوت بود. هم‌چنین در بیان درصدی می‌توان اظهار داشت که میزان نوارهای چندشکل درون اکوتیپ‌ها در30 اکوتیپ مورد مطالعه از 46/15 درصد در اکوتیپ شماره 12(تبریز-اسپره خون) تا 87/18 درصد در اکوتیپ 27 (ورزقان-جوشین) متفاوت بود (جدول3).

گراردی و همکاران (Gherardi *et al*., 1997) نیز تنوع ژنتیکی در 8 اکوتیپ یونجه را با استفاده از ده آغازگر RAPD بررسی کردند میانگین درصد چند شکلی درون جمعیتی در بررسی آن‌ها 70/87 درصد بود. میانگین تعداد نوارهای چندشکلی RAPD در یونجه در مطالعات یو و *پائولس* (Yu & Pauls 1993)، نگری و همکاران (Negri *et al*., 1995) و منگونی و همکاران (Mengoni *et al*., 2000) به‌ترتیب 5، 8/6 و 5/12 گزارش شده است. زیاد بودن تعداد نوار به ازای هر نشانگر، نشان از تنوع زیاد در بین ارقام مورد مطالعه است (Agrama & Tuinstra 2003). زیاد بودن تعداد نشانگر می‌تواند ناشی از سطح بالای پلوئیدی نیز باشد (Kidwell *et al*., 1994). نمونه‌ای از الگوی نواربندی با آغازگرهای متفاوت در اکوتیپ مرند (شماره 4) در شکل یک نشان داده شده است.

برآورد تنوع ژنتیکی درون اکوتیپ های یونجه

تنوع ژنتیکی درون اکوتیپ‌ها براساس شاخص نی و شاخص شانون محاسبه گردید (Nei 1972; Nei 1973; Nei; 1975 Shannon & Weaver 1949). بیشترین میانگین سطح تنوع ژنتیکی براساس هر دو شاخص نی (0/2813) و شانون (0/4205) در اکوتیپ 27 (ورزقان-جوشین) مشاهده شد که حاکی از تطابق برآورد تنوع در هر دو شاخص بود. ولی کمترین میزان تنوع ژنتیکی براساس شاخص نی (0/1567) مربوط به اکوتیپ 19(بستان‌آباد-باش‌کند) و براساس شاخص شانون (0/2434) کم‌ترین میزان تنوع مربوط به اکوتیپ شماره 12 (تبریز-اسپره خون) بود (جدول 3).

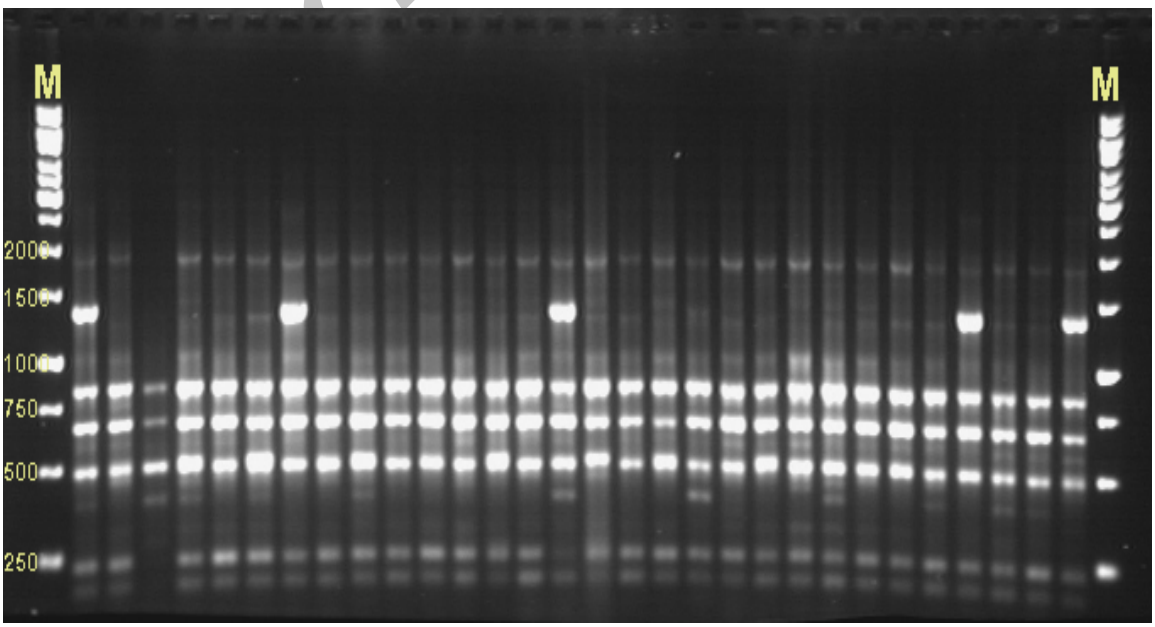
Archive of SID
www.SID.ir

جدول3: میانگین تنوع ژنتیکی در 30 اکوتیپ یونجه

Table 3: The mean of genetic diversity in 30 alfalfa ecotype based on RAPD analysis

اکوتیپ Ecotype	تعداد نوار چندشکل Number of bands	درصد نوارچندشکل Polymorphic loci (%)	میانگین تنوع ژنتیکی نی Nei's gene diversity	شاخص شانون Shannon index
1	45	57.69	0.2049	0.3064
2	45	57.69	0.2081	0.3102
3	39	50.00	0.1823	0.2690
4	42	53.85	0.1847	0.2768
5	47	60.26	0.2089	0.3132
6	44	56.41	0.1969	0.2953
7	54	69.23	0.2083	0.3187
8	45	57.69	0.2001	0.3013
9	50	64.10	0.2098	0.3165
10	52	66.67	0.2271	0.3428
11	62	79.49	0.2571	0.3891
12	36	46.15	0.1633	0.3434
13	52	66.67	0.1912	032972
14	46	58.97	0.2027	0.3043
15	42	53.85	0.1891	0.2816
16	51	65.38	0.2243	0.3377
17	48	61.54	0.2205	0.3294
18	47	60.26	0.2039	0.3076
19	52	66.67	0.1567	0.2542
20	41	56.56	0.1744	0.2632
21	51	65.38	0.2201	0.3299
22	49	62.82	0.2162	0.3248
23	59	75.64	0.2299	0.3517
24	40	51.28	0.1756	0.2631
25	63	80.77	0.2464	0.3723
26	53	67.95	0.2242	0.3383
27	68	87.18	0.2813	0.4205
28	41	52.56	0.1744	0.2613
29	66	84.62	0.2812	0.4185
30	50	64.10	0.2001	0.3082

Archive of SID



شکل1: الگوی نوار بندی 30 نمونه از اکوتیپ مرند (شماره 4) با آغازگر B6

Fig 1: RAPD fragments for Marand ecotype (Ecotype 4) using the primer B6

www.SID.ir

فاصله ژنتیکی براساس شاخص F_{ST}

اندازه گیری فاصله دوبدوی اکوتیپ‌ها بر اساس فاصله ژنتیکی F_{ST} نشان داد که حداکثر این فاصله بین اکوتیپ‌های مرند-زنورق و بستان‌آباد- باش‌کند (شماره‌های4 و 19) برابر0/63637 و حداقل فاصله بین اکوتیپ‌های ورزقان-جوشین و ورزقان-الهرد (شماره‌های 27و 29) برابر0/03551 بود. این نتایج بسیار منطقی به‌نظر می‌رسند چرا که دو اکوتیپ اولی از نظر جغرافیایی در فاصله دور از هم قرار گرفته‌اند و منطقه مورد کشت دو اکوتیپ دیگر نیز کاملا در مجاورت هم است. هم‌چنین این نتایج حاکی از تنوع خیلی زیاد در درون اکوتیپ‌های یونجه است که ناشی از طبیعت آلوگام و دگرگشنی این گیاه می‌باشد (Jenczewski *et al*., 1992; Mengoni *et al*., 2000).

فاصله ژنتیکی براساس ضریب همنسبی

اندازه‌گیری فاصله اکوتیپ‌ها براساس ضریب همنسبی نیز نتایجی مشابه با شاخص F_{ST} نشان داد. بر اساس این شاخص نیز دو اکوتیپ مرند- زنورق و بستان‌آباد-باش‌کند (شماره‌های4 و 19) دارای بیشترین فاصله (0/9999) و دو اکوتیپ ورزقان-جوشین و ورزقان-الهرد (شماره‌های 27 و 29) دارای کمترین فاصله (0/036156) نسبت به یکدیگر بودند.

تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA)

نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی نشان‌داد که تنوع ژنتیکی بین و درون 30 اکوتیپ یونجه مطالعه شده در این بررسی معنی‌دار است. از تنوع ژنتیکی کل (100%) 34/63 درصد آن مربوط به تنوع ژنتیکی بین اکوتیپ‌ها و 65/37 درصد آن مربوط به تنوع درون اکوتیپ‌ها بود. بنابراین واریانس درون اکوتیپ‌ها سهم عمده‌ای از واریانس کل را شامل می‌شود ولی میزان واریانس بین اکوتیپ‌ها نیز قابل توجه بود (جدول 4). این موضوع با یافته‌های فلاجولت و همکارن (Flajoulot *et al*., 2005) مطابقت نشان داد. آن‌ها تنوع قابل ملاحظه‌ای در درون 7 جمعیت اصلاح شده یونجه نسبت به بین آن‌ها به‌دست آوردند. در سایر بررسی‌های تنوع یونجه با استفاده از نشانگرهای RAPD، واریانس درون جمعیتی، حدود50 درصد یا بیشتر واریانس ژنتیکی کل را شامل شده است (Gherardi *et al*, 1997). میزان بالای واریانس درون جمعیتی حتی در صفات کیفی مثل قابلیت هضم و درصد سلولز (Heinrichs *et al*., 1969)، نسبت برگ به ساقه، قابلیت هضم آنزیمی، وزن خشک و اسید تجزیه کننده لیگنین و سلولز (Julier *et al*., 2000) هم مشاهده شده است که نشان دهنده هم‌خوانی زیاد صفات مورفولوژیکی به‌ویژه صفات کیفی و نشانگرهای مولکولی است .

نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی با میانگین درجه تمایز ژنی یا Gst (0/3335) مطابقت نشان داد. با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان بیان داشت که برخی از اکوتیپ‌های یونجه منبع بالقوه‌ای برای ژن‌های مختلف هستند. یونجه گیاهی است دگرگشن که تنوع بالای درون اکوتیپی در آن ناشی از سیستم تولید مثلی گیاه است و همانند دیگر گونه‌های دگربارور چنان‌که انتظار می‌رفت تنوع ژنتیکی درون اکوتیپ‌ها بیشتر از تنوع ژنتیکی بین اکوتیپ‌ها است.

تجزیه خوشه‌ای براساس داده های مولکولی

برای تعیین روابط ژنتیکی، 30 اکوتیپ یونجه با استفاده از ماتریس ضرایب همنسبی مورد تجزیه خوشه‌ای قرار گرفتند. در این بررسی برای رسم دندروگرام دو روش UPGMA و CLINK براساس فاصله ژنتیکی نی به‌ترتیب با ضریب همبستگی کوفنتیک r=0/73 و r= 0/62 مورد استفاده قرار گرفتند.

جدول4: تجزیه واریانس مولکولی برای 30 اکوتیپ یونجه

Table 4: Analysis of molecular variance for 30 alfalfa ecotypes

منبع تغییر Source of variation	درجه آزادی d.f.	مجموع مربعات انحرافات Sum of squares	درصد واریانس Variation (%)	سطح معنی‌دار Prob.
بین اکوتیپ‌ها Among ecotypes	29	3832.589	34.63	0.00
درون اکوتیپ‌ها Within ecotypes	870	6805.400	65.37	0.00
F_{ST} :			0.3463	

Archive of SID
www.SID.ir

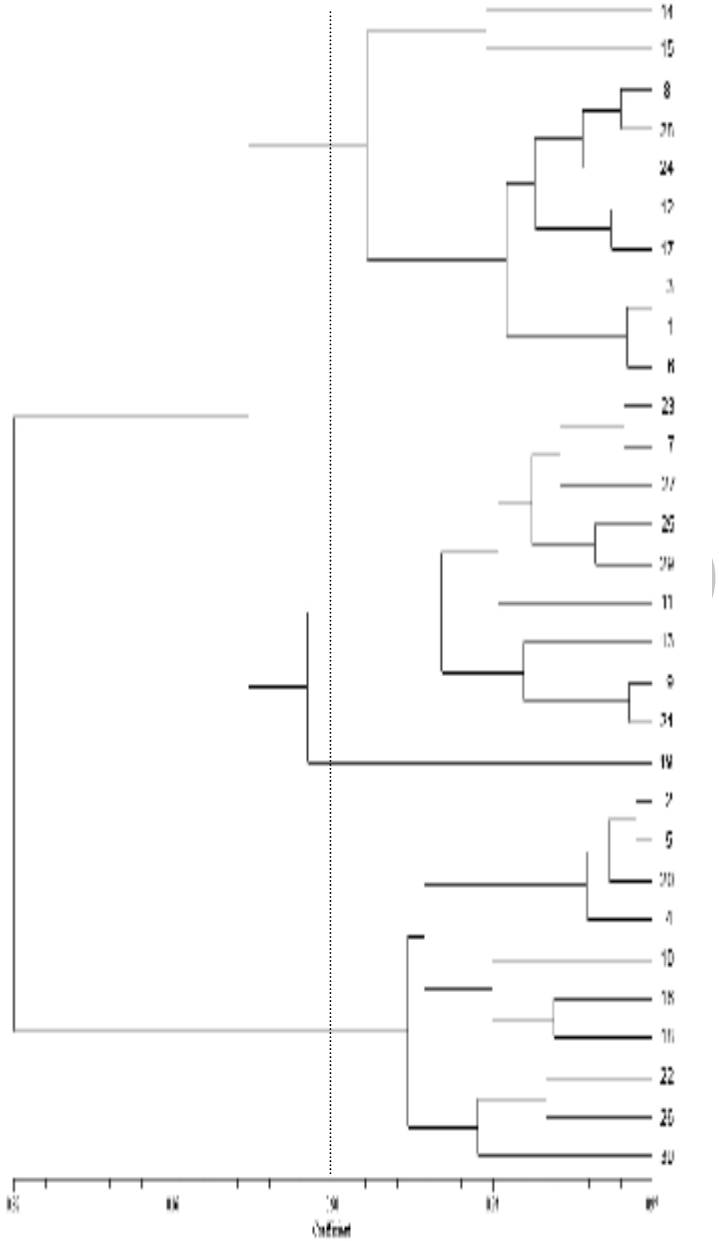
براساس گروه‌بندی حاصل از هر دو الگوریتم 30 اکوتیپ یونجه به چهار گروه تقسیم شدند. دندروگرام حاصل از هر دو الگوریتم تشابه زیادی نشان دادند به‌طوری که خوشه‌ها در مقایسه با خوشه همتای خود در دندروگرام دیگر دارای اکوتیپ‌های مشابهی بودند، ولی روش UPGMA براساس فاصله ژنتیکی نی با دارا بودن ضریب کوفنتیک بالاتر انتخاب گردید (شکل 2).

در گروه اول اکوتیپ‌های شماره ذوالبین - زاویه - اسماعیل آباد - چلناب - گوراوان - اسپره خون - اکرم آباد - لقلان - مارزاد - خورخور، در گروه دوم اکوتیپ‌های با شماره‌های خواجه - ساتلو - جوشین - دیزج صفر علی - الهرد - کرده ده - قره بابا - گل تپه - بافتان ، در گروه سوم اکوتیپ شماره 19(بستان‌آباد- باش کند) و در گروه چهارم اکوتیپ‌های قرانچای-سیران-عین الدین –زنورق-آلمالو-سیویار-باسین-ایلانجوق-کردلر-و قره‌یونجه اصلاح شده قرار گرفتند. اکوتیپ اصلاح شده قره‌یونجه در این کلاستر قرار گرفت. همه اکوتیپ‌های متعلق به منطقه ورزقان و مراغه در یک گروه (گروه دوم) قرار گرفتند. اکوتیپ شماره 19 که به صورت انفرادی یک گروه منحصر به‌فرد را تشکیل داد از نظر ویژگی‌های اقلیمی نیز متمایز از سایر اکوتیپ‌ها بود. منطقه مورد کشت این اکوتیپ دارای 2400 متر ارتفاع از سطح دریا و جزو اقلیم بسیار سرد می‌باشد (Khalili 1992). به‌نظر می‌رسد ارتفاع ناحیه جغرافیایی اکوتیپ‌ها دارای بیشترین سهم در تاثیرگذاری بر ساختار ژنتیکی آن‌ها بوده است. با توجه به وجود تنوع ژنتیکی زیاد در ژرم‌پلاسم مورد مطالعه، می‌توان از این پتانسیل ژنتیکی غنی برای انتخاب ژنوتیپ‌های متنوع به منظور تولید ارقام جدید استفاده کرد.

در کل نتایج این پژوهش نشان‌داد تنوع ژنتیکی و غیر یکنواختی زیادی درون جمعیت‌های بومی وجود دارد و می‌توان از این جمعیت ها برای انتخاب ژنوتیپ‌های متنوع به منظور تولید ارقام جدید استفاده کرد. به‌نظر می‌رسد ارتفاع ناحیه جغرافیایی اکوتیپ‌ها دارای بیشترین سهم در تأثیرگذاری برروی ساختار ژنتیکی آن‌ها بوده است و استفاده از نشانگرهای RAPD می‌تواند روش مناسبی برای تعیین تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت‌های یونجه باشد.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل 2: تجزیه خوشه‌ای 30 اکوتیپ یونجه بر اساس فاصله ژنتیکی (Nei) به روشUPGMA

Fig 2: Clustering of 30 alfalfa ecotypes based on Nei's generic distance using UPGMA method

منابع:

جهت ملاحظه منابع به صفحه‌های 7-8 متن انگلیسی مراجعه شود.

www.SID.ir