زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس
دوره 8، شماره 1، بهار و تابستان 1396

ارزیابی تنوع ژنتیکی تعدادی از ژنوتیپ‌های یونجه یک‌ساله (*Medicago truncatula*) با استفاده از نشانگرهای ISSR

حمید حاتمی ملکی[1*]، سمیه داداشی[2]، سکینه کلاهی زاده[3]
1- استادیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه
2و3- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه

*** مراغه، صندوق پستی 533**
hatamimaleki@maragheh.ac.ir
(دریافت مقاله: 94/9/15 پذیرش مقاله: 95/6/29)

چکیده- جنس یونجه (*Medicago*) از خانواده بقولات (Fabaceae) و یکی از مهمترین لگوم‌های علوفه‌ای می‌باشد. گونه‌های یک‌ساله موجود در این جنس بومی مناطق مدیترانه‌ای بوده که برای جلوگیری از فرسایش خاک و تولید کود سبز و علوفه استفاده می‌گردند. در این تحقیق، ارزیابی تنوع ژنتیکی و گروه‌بندی 14 ژنوتیپ یونجه یک‌ساله *M. truncatula* با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR انجام شد. تعداد 9 آغازگر ISSR از میان 15 آغازگر با چندشکلی و تکثیر مناسب در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، برای انگشت‌نگاری ژنوتیپ‌های مورد مطالعه استفاده شدند. در مجموع تعداد 71 نوار بوسیله آغازگرهای ISSR تکثیر شد که تعداد 11 نوار در بین تمام ژنوتیپ‌ها یک شکل و 60 نوار چندشکل بودند. با استفاده از ضریب تشابه جاکارد، کمترین شباهت (0/25) بین ژنوتیپ TN8.3 (تونس) با TN6.18 (تونس) و بیشترین شباهت (0/82) بین دو ژنوتیپ TN8.3 (تونس) و SA28064 (مصر) مشاهده شد. تجزیه ساختار جمعیتی با استفاده از نرم‌افزار STRUCTURE، ژنوتیپ‌ها را در 9 زیرجمعیت قرار داد. در این مطالعه، بیشترین اختلاط در ژنوتیپ‌های TN1.21 (تونس)، A10 (استرالیا)، F83005-5 (فرانسه)، SA22322 (سوریه)، A20 (استرالیا) و DZA315-16 (الجزایر) مشاهده گردید. نتایج نشان داد که یونجه یک‌ساله *M. truncatula* باوجود خودگشن بودن، دارای تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای بوده و این تنوع بطور دقیق با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR قابل تشخیص است.

کلیدواژگان: یونجه یک‌ساله، نشانگر ISSR، ساختار جمعیت، تنوع ژنتیکی.

1- مقدمه

جنس یونجه (*Medicago*) از خانواده بقولات (Fabaceae)، یکی از مهمترین لگوم‌های علوفه‌ای است که در مناطق معتدل جهان پراکنش دارد. این جنس دارای 56 گونه بوده که 22 گونه آن چندساله و دگرگشن (از جمله گونه زراعی *M. sativa*) و 34 گونه آن، یک ساله و خودگشن می‌باشند [1]. بیشتر گونه‌های چند ساله یونجه، تتراپلوئید (2n=4x=32) و تعدادی از آن‌ها دیپلوئید

(2n=2x=16) می‌باشند و تنها دو گونه *M. saxatillis* M. B. و *M. cancellata* M. B. هگزاپلوئید (2n=6x=48) هستند. گونه‌های یک‌ساله به حالت دیپلوئید با فرمول کروموزومی 2n=2x=16 می‌باشند، به استثنای 4 گونه *M. murex* Willd.، *M. praecox* DC.، *M. polymorpha* L. و *M. rigidula* Desr. که دارای 2n=2x=14 کروموزوم هستند و *M. scutellata* Mill. و *M. rugosa* Desr. تنها گونه‌های یک‌ساله تتراپلوئید با 2n=4x=30 کروموزوم می‌باشند [2]. یونجه‌های یک‌ساله از خویشاوندان نزدیک یونجه زراعی (*Medicago sativa* L.) هستند که بومی مناطق مدیترانه‌ای بوده و دارای رشد سریع و علوفه مطلوبی می‌باشند [2]. گیاهان این گونه‌ها دارای ژن‌های مفید زیادی از جمله ژن‌های دخیل در مقاومت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی بوده و برای جلوگیری از فرسایش خاک و تولید کود سبز و علوفه (به عنوان چراگاه برای دام) مورد استفاده قرار می‌گیرند [2]. همچنین، یونجه‌های یک‌ساله به دلیل داشتن ژنوم کوچک (500 Mbp)، دیپلویید بودن و چرخه زندگی کوتاه به عنوان گیاه مدل در خانواده بقولات محسوب می‌شوند [3]. پراکنش انواع یونجه‌های یکساله در سطح جهانی به خصوص مناطق خشک و نیمه خشک نشان دهنده مقاومت این گیاه در برابر شرایط کم آبی است. از طرفی در مناطق با زمستان خیلی سرد که زنده ماندن یونجه‌های چند ساله (دائمی) امکان‌پذیر نیست می‌توان از یونجه‌های یکساله به عنوان جانشین استفاده کرد.

تنوع ژنتیکی رکن اصلی بیشتر برنامه‌های به‌نژادی گیاهی بوده و اطلاع از سطح تنوع موجود در ژرم پلاسم‌ها و خزانه‌های ژنی برای تشخیص تکرارها در بانک‌های ژنی، غنی‌سازی ذخایر ژنی از طریق اینتروگرسیون ژن‌های مطلوب و شناسایی ژن‌های مناسب ضروری به نظر می‌رسد. این تغییرات ژنتیکی در جمعیت‌های گیاهی می‌تواند به وسیله مکانیسم‌های مختلف از قبیل جهش، نوترکیبی ژنتیکی، مهاجرت، جریان ژنی، رانده شدگی ژنتیکی و گزینش بوجود آید. ارزیابی تنوع ژنتیکی و گروه‌بندی افراد می‌تواند بر پایه نشانگرهای مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی DNA صورت گیرد. اگرچه ارزیابی تنوع ژنتیکی یونجه شامل یونجه‌های زراعی چندساله و یونجه‌های یک‌ساله بوسیله نشانگرهای مورفولوژیک انجام گرفته [4]، ولی به دلیل محدودیت‌هایی از قبیل تعداد محدود، تاثیرپذیری از محیط، عدم توزیع یکنواخت در ژنوم و غیره در نشانگرهای مورفولوژیک، نشانگرهای مولکولی DNA برای مطالعه تنوع ژنومی در ژرم‌پلاسم یونجه پیشنهاد می‌گردد. نشانگرهای مولکولی DNA به دلیل عدم تأثیرپذیری از شرایط محیطی، وراثت‌پذیری و فراوانی بالا از ابزارهای مؤثر برای دستیابی به درک بهتر تنوع ژرم-پلاسم می‌باشند [5]. یکی از انواع نشانگرهای DNA، نشانگر ISSR[1] می‌باشد که توسط Zietkiewicz و همکاران [6] معرفی گردیده است. در نشانگر ISSR توالی‌های ریزماهواره‌ها به عنوان آغازگر به کار رفته و قطعات DNA بین دو ناحیه‌ی ریزماهواره‌ای تکثیر می‌یابند. از ویژگی‌های بارز نشانگرهای ISSR می‌توان به چند مکانی بودن، چند شکلی نسبتاً بالا و عدم نیاز به اطلاعات در مورد توالی ژنومی جهت طراحی آغازگر اشاره نمود [7]. آغازگرهای ISSR امکان تکثیر قطعاتی از DNA را فراهم می‌آورند که بین دو ریزماهواره[2] قرار داشته و به اندازه کافی به هم نزدیک هستند (2000bp-200) [8]. گزارشات اخیر بر روی جمعیت‌های بومی سایر انواع گیاهان، ماهیت فوق‌العاده متنوع این نشانگرها و نیز پتانسیل آنها را در مطالعه سطوح مختلف جمعیتی نشان می‌دهد [9].

مطالعات متعددی در زمینه ارزیابی تنوع ژنتیکی ژرم‌پلاسم یونجه با استفاده از نشانگرهای مولکولی DNA از قبیل

[1] Inter Simple Sequence Repeat
[2] Simple Sequence Repeat

SSR [10،11]، AFLP[1] [12]، IRAP[2] و REMAP[3] [13] وجود دارد. در تحقیقی Falahati Anbaran و همکاران [11] تنوع ژنتیکی درون و بین گونه‌ای و روابط خویشاوندی چهار گونه یونجه یک ساله دیپلوئید شامل (*M. truncatula*، *M. rigidula*، *M. orbicularis*، *M. minima*) و دو گونه یونجه یک‌ساله تتراپلوئید شامل (*M. rugosa* و *M. scutellata*) با استفاده از 6 جفت آغازگر ریزماهواره مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که در مجموع 25 آلل چند شکل در بین گونه‌های مورد مطالعه وجود دارد و نشانگرهای ریزماهواره دارای کارایی بالایی در تعیین میزان تنوع ژنتیکی درون و بین گونه‌ای و روابط خویشاوندی و تکاملی گونه‌های یونجه می‌باشند. همچنین، در مطالعه‌ای که توسط Akritidis و همکاران [10] با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره انجام گردید، در مجموع 42 آلل چند شکل در بین ژنوتیپ‌های مختلف دو گونه *M. truncatula* و *M. littoralis* بدست آمد و نشان داد که نشانگرهای ریز ماهواره با کارایی بالایی در شناسایی تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای و روابط خویشاوندی و تکاملی گونه‌های مختلف یونجه در کشور یونان مورد استفاده قرار گرفته است.

تاکنون مطالعات مختلفی در مورد استفاده از نشانگرهای ISSR در بررسی تنوع ژنتیکی موجود در جنس *Medicago* انجام گرفته است. در یک بررسی [14]، تنوع ژنتیکی 80 ژنوتیپ یونجه زراعی (*M. sativa*) توسط 16 آغازگر ISSR بررسی شد و در مجموع 117 نوار با میانگین 7/3 مکان ژنی برای هر آغازگر بدست آمد. با توجه به مطالعات Abdollahi Mandulakani و همکاران [13]، نشانگرهای ISSR با دارا بودن متوسط اطلاعات چندشکلی[4] 0/77، نشانگرهای مناسبی جهت شناسایی والدین مناسب برای تهیه جمعیت‌های نقشه‌یابی و تولید ارقام هیبرید در یونجه زراعی می‌باشند.

یونجه‌های یکساله در زمره گیاهان تروفیت بوده که توسعه وسیع گونه‌های مختلف آن در ایران نشـان از سازگاری این گیاهان با شرایط اقلیمی اغلب نقاط کشور بخصوص با شرایط pH قلیایی و وجود کربنات کلسیم فراوان در اغلب خاک‌ها می‌باشد. یونجه‌های یکساله پتانسیل مناسبی برای ایـجـاد پایداری در سیستم‌های زراعی مختلف دارند و می‌توان از این گیاهان در ایجاد سیستم زراعی غله-مرتع و یا به عنوان کود سبز، گیاه پوششی یا گیاه خفه کننده استفاده کرد. با توجه به اهمیت گونه‌های یک‌ساله یونجه و عدم وجود گزارش‌های کافی در زمینه ارزیابی تنوع ژنتیکی ژرم پلاسم یونجه یک‌ساله بویژه با نشانگرهای ISSR، این پژوهش، با هدف بررسی تنوع ژنتیکی یونجه-های یک‌ساله با نشانگرهای ISSR انجام گرفت.

2- مواد و روش‌ها

2-1- مواد گیاهی و استخراج DNAی ژنومی

در این مطالعه بذرهای 14 ژنوتیپ یونجه یک‌ساله (*M. truncatula*) (جدول 1)، از موسسه تحقیقات کشاورزی فرانسه INRA[5] تهیه و پس از کشت بذور در گلدان‌ها، استخراج DNAی ژنومی از برگ گیاهچه‌های 10 تا 15 روزه با استفاده از روش Doyle & Doyle [15] در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه مراغه انجام شد. کمیت و کیفیت DNAهای استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و الکتروفورز ژل آگارز 0/8% تعیین گردید.

2-2- واکنش زنجیره‌ای پلی مراز

برای این منظور از 15 نشانگر ISSR طراحی شده در دانشگاه بریتیش کلمبیا[6] استفاده شد.

[1] Amplified Fragment Length polymorphism
[2] Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism
[3] Retrotransposon Microsatellite Amplified Polymorphism
[4] Polymorphism Information Content
[5] Institut National de la Recherche Agronomique
[6] UniversityofBritishColombia

جدول 1 کد، نام و منشاء ژنوتیپ‌های یونجه یک‌ساله (*M. truncatula*) مورد مطالعه

کد	ژنوتیپ	منشاء
G01	TN1.21	Tunisia
G02	TN8.3	Tunisia
G03	TN6.18	Tunisia
G04	SA26063	Morocco
G05	SA28064	Cyprus
G06	Salses42B	France
G07	A17	Australia
G08	A10	Australia
G09	ESP105-L	Spain
G10	TN1.11	Tunisia
G11	F83005-5	France
G12	SA22322	Syria
G13	A20	Australia
G14	DZA315-16	Algeria

برای شناسایی دمای اتصال بهینه برای آغازگرهای مورد بررسی از PCR گرادیانت[1] استفاده گردید. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم نهایی 25 میکرولیتر شامل µl 2/5 بافر با غلظت 10 برابر، 4 میکرولیتر dNTP با غلظت 25 میلی‌مولار، 1 میکرولیتر کلرید منیزیم 50 میلی‌مولار، 0/3 میکرولیتر آنزیم DNA پلیمراز ، 11/2 میکرولیتر آب دوبار تقطیر، 1 میکرولیتر آغازگر ISSR با غلظت 10 میکرومولار و 5 میکرولیتر DNA با غلظت 5 نانوگرم در میکرولیتر انجام شد. برنامه دمایی PCR شامل واسرشته-سازی اولیه به مدت 4 دقیقه در دمای 94 درجه سانتی-گراد، 34 چرخه بصورت واسرشته‌سازی به مدت 45 ثانیه در دمای 94 درجه سانتی‌گراد، اتصال آغازگر به مدت 1 دقیقه در دمای مناسب اتصال برای هر آغازگر (جدول 2)، مرحله توسعه رشته جدید به مدت 2 دقیقه در دمای 72 درجه سانتی‌گراد و در نهایت توسعه نهایی به مدت 10 دقیقه در دمای 72 درجه سانتی‌گراد بود. محصولات PCR در ژل آگارز 2/5 درصد از همدیگر تفکیک شدند.

[1] Gradient Polymerase Chain Reaction

3-2- تجزیه‌های آماری

امتیازدهی الگوی باندها در ژل، به صورت یک برای وجود نوار و صفر برای عدم وجود نوار صورت گرفت. تعداد نوار تکثیر شده، تعداد نوار چندشکل و درصد چندشکلی برای هر آغازگر بدست آمد. تشابه بین ژنوتیپ‌ها براساس ضرایب تشابه Jaccard [16] و با استفاده از نرم‌افزار NTSYS [17] محاسبه گردید.

با بکارگیری روش Bayesian در نرم‌افزار STRUCTURE 2.3.4، تجزیه مؤثر ساختار جمعیت و دسته‌بندی دقیق ژنوتیپ‌ها به زیر جمعیت‌های مناسب و تشخیص ژنوتیپ‌های اختلاط یافته انجام گرفت [18]. در این نرم‌افزار، مقادیر زیرجمعیت فرضی اولیه (مقادیر اولیه K) بین 1 تا 10 در نظر گرفته شد و برای هر کدام از زیرجمعیت‌ها جهت افزایش دقت، 5 تکرار لحاظ گردید. همچنین برای حصول منحنی حداکثر درست‌نمایی از مدل Admixture و استقلال فراوانی آللی با 10000 تکرار آزمایش (Burn-in) و 10000 تکرار MCMC (Markov Chain Monte Carlo) استفاده گردید [19].

3- نتایج و بحث

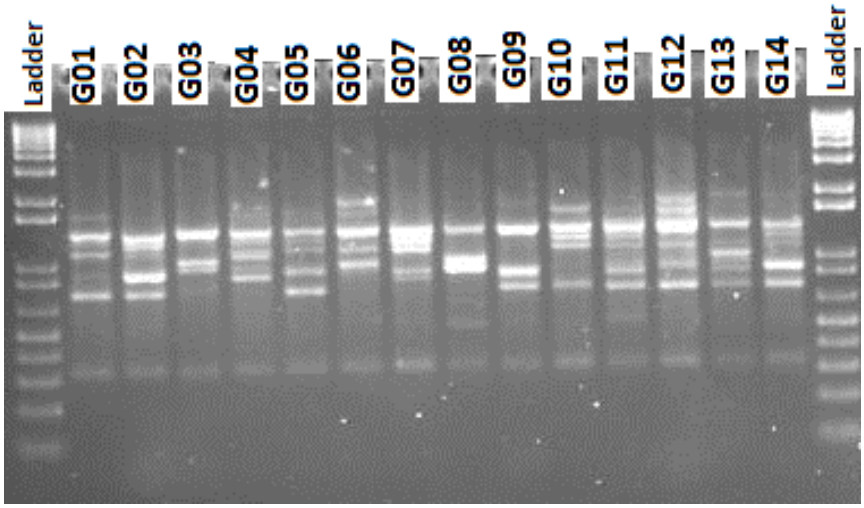
با توجه روند تخریبی مراتع و کمبود شدید علوفه و از طرف دیگر وجود حدود 1 تا 2 میلیون هکتار از اراضی آیش کشور ایران در مناطق گرم با آب و هوای مدیترانه‌ای که در معـرض شدید فرسایش قرار دارند، اهمیت ارزیابی ژرم پلاسم یونجه‌های یک‌ساله به منظور استفاده از آن‌ها در برنامه‌های به‌نژادی این گیاه و یا استفاده از آن‌ها در تناوب با غله دیم روشـن می‌گردد. در این مطالعه، از میان 15 آغازگر ISSR بکار گرفته شده، 9 آغازگر ISSR (جدول 2) دارای چندشکلی مناسبی بوده و برای انگشت-نگاری ژنوتیپ‌ها مورد استفاده قرار گرفتند. در مجموع 71 نوار توسط آغازگرهای ISSR تکثیر شدند که از بین آن‌ها تعداد 11 نوار در بین تمام ژنوتیپ‌ها یک شکل بوده

و 60 نوار چندشکلی نشان دادند (جدول 2). در شکل 1، نمونه‌ای از الگوی نواربندی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه با آغازگر UBC814 نشان داده شده است.

نتایج نشان داد که در این مطالعه بیشترین تعداد نوار چندشکل (12 عدد) مربوط به آغازگر UBC814 و کمترین تعداد نوار چندشکل (4 عدد) مربوط به آغازگرهای UBC827 و UBC872 بود (جدول 2). در مطالعه‌ی Azizi و همکاران [14] که به منظور بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های یونجه زراعی با استفاده از نشانگرهای ISSR انجام گرفت، تعداد نوارهای تکثیر شده توسط آغازگرهای ISSR بین 3 تا 12 متغیر بودند. از طرفی آن‌ها [14] نشان دادند که 16 آغازگر مورد استفاده در مجموع 117 مکان ژنی را تکثیر می دهند که 91 عدد از آن‌ها چندشکل می باشند.

جدول 2 نام، توالی، تعداد نوار تکثیر یافته و درصد چندشکلی در آغازگرهای ISSR مورد مطالعه

نام آغازگر	توالی	تعداد توار تکثیر شده	تعداد نوار چندشکل	درصد چندشکلی
UBC 807	$(CA)_{10}G$	11	9	0/81
UBC808	$(CA)_{7}G$	8	6	0/75
UBC810	$(AC)_{9}G$	8	8	1
UBC814	$(CT)_{8}A$	14	12	0/85
UBC 820	$(GA)_{6}CC$	6	5	0/83
UBC 827	$(GT)_{8}CC$	6	4	0/66
UBC829	$(ACC)_{6}C$	7	7	1
UBC872	$(GA)_{8}A$	5	4	0/8
UBC 880	$(TC)_{10}C$	6	5	0/83
میانگین		7/88	6/66	0/83



شکل 1 الگوی نواری حاصل از تکثیر DNAی ژنومی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه با استفاده از آغازگرUBC 814. چاهک‌های انتهایی، نشانگر وزن مولکولی 1kb می‌باشند.

با توجه به اینکه در نشانگر ISSR (جدول 2) تعداد زیادی مکان ژنی بطور همزمان شناسایی می‌شوند، نشانگرهای ISSR می‌توانند جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های با درجات مختلفی از شباهت و بویژه بین ژنوتیپ‌های با فاصله ژنتیکی کم و همچنین اشباع نقشه‌های پیوستگی موجود در یونجه‌های یک‌ساله استفاده شوند. کارایی نشانگرهای ISSR در مطالعه ژرم پلاسم گیاه یونجه توسط Azizi و همکاران [14] و Abdollahi Mandulakani و همکاران [13] اثبات گردیده است. نتایج این تحقیق نشان می دهد که درصد چند شکلی از 100 درصد برای آغازگرهای UBC810 و UBC829 الی 66 درصد برای آغازگر UBC827 متغیر بود (جدول 2). متوسط درصد چندشکلی 83 درصد (به طور متوسط 6.66 نوار به ازای هر آغازگر) می‌باشد (جدول 2). درصد چندشکلی نسبتاً بالا نیز بیانگر وجود تنوع ژنتیکی در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه می‌باشد. از طرفی، مقادیر بالای درصد چندشکلی مشاهده شده در این تحقیق دلالت بر وجود آلل یا آلل‌های نادر در یک جایگاه نشانگری است که در تفکیک و تمایز افراد نقش بسزایی دارد. چندشکلی بالای نشانگرهای ISSR توسط محققین دیگر در گیاهان دیگری مانند آفتابگردان [20]، توتون [21] و پسته ایرانی [22] نیز گزارش شده است. از طرفی، وجود تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای که نتایج این پژوهش نیز موید آن است، نوید دهنده امکان اصلاح و ایجاد واریته‌های مناسب برای شرایط متنوع اقلیمی ایران با استفاده ژنوتیپ‌های خارجی مورد مطالعه می باشد.

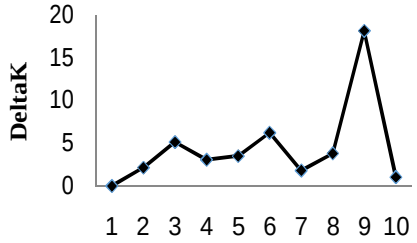
ارزیابی تنوع ژنتیکی و گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها پیش نیاز برنامه‌های دورگ‌گیری در گیاهان خودگشن است. همچنین، در گیاهان دگرگشن نظیر یونجه زراعی نیز می‌توان از تلاقی تصادفی تعدادی والد (واریته ساختگی یا سنتتیک) با ترکیب پذیری عمومی بالا و فاصله ژنتیکی زیاد از پدیده هتروزیس سود جست. در این مطالعه شباهت ژنتیکی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه با استفاده از ضریب تشابه جاکارد [23] محاسبه گردیده و در جدول 3 آورده شده است. در این بررسی، کمترین شباهت (25 درصد) که بیانگر بیشترین واگرایی است بین ژنوتیپ TN8.3 (تونس) با TN6.18 (تونس) و بیشترین شباهت (0/82) بین دو ژنوتیپ TN8.3 (تونس) و SA28064 (مصر) مشاهده گردید (جدول 3). از طرفی، در مطالعات قبلی [11] و در بررسی تنوع ژنتیکی گونه‌های مختلف یونجه یک‌ساله با استفاده از نشانگرهای SSR، میزان شباهت گونه‌های یک‌ساله بر اساس ضریب تشابه جاکارد بین صفر الی 0/62 متغیر بود. با توجه به یافته‌های این تحقیق، واضح است که نشانگرهای ISSR می‌توانند به نحو مطلوبی برای شناسایی تنوع موجود در نواحی بین ریزماهواره‌ای در ژنوم یونجه یک‌ساله و شناسایی افراد با فاصله ژنتیکی زیاد (گروه‌های هتروتیک) بکار روند. نتایج این پژوهش نشان داد که تنوع درون گونه‌ای قابل ملاحظه‌ای در ژنوتیپ‌های خارجی یونجه یک‌ساله *M. truncatula* وجود دارد. این در حالی است که Falahati Anbaran و همکاران [11] در بررسی تنوع ژنتیکی گونه‌های دیپلویید و تتراپلویید یونجه یک‌ساله با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره بیان نمودند که تنوع درون گونه‌ای در یونجه‌های یک‌ساله کمتر از تنوع بین گونه‌ای بوده و در برخی از گونه‌ها از قبیل *M. regosa* و *M. scutellata* مقدارتنوع درون گونه‌ای صفر می‌باشد.

با توجه به جدول 3، تشابه و فاصله ژنتیکی ژنوتیپ‌ها با فواصل جغرافیایی آنها مطابقت نداشت. در توافق با یافته‌های این بررسی، در تحقیقات قبلی [10] با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره در توده‌های مختلف از یونجه‌های یک‌ساله *M. truncatula* و *M. littorialis* نشان داده شده که شباهت ژنتیکی با فاصله جغرافیایی آنها مطلبقت ندارد. نتایج گروه‌بندی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه به زیرجمعیت‌های متمایز از نظر ژنتیکی با استفاده از

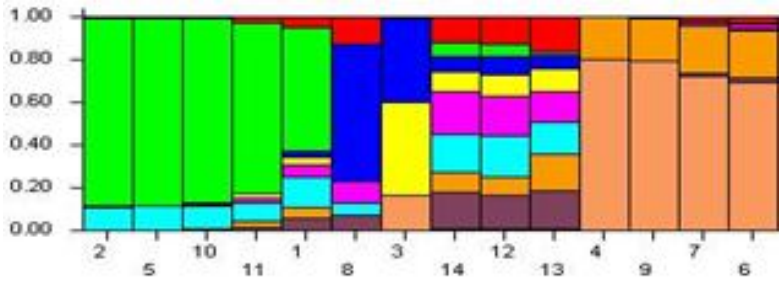
نرم‌افزار STRUCTURE [18] در شکل‌های 2 و 3 نشان داده شده است.

جدول 3 مقدار ضریب تشابه جاکارد بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه یونجه یک‌ساله با استفاده از 71 نشانگر ISSR

	G01	G02	G03	G04	G05	G06	G07	G08	G09	G10	G11	G12	G13	G14
G01	1/00													
G02	0/62	1/00												
G03	0/31	**0/25**	1/00											
G04	0/51	0/52	0/31	1/00										
G05	0/67	**0/82**	0/33	0/53	1/00									
G06	0/44	0/49	0/35	0/65	0/48	1/00								
G07	0/46	0/49	0/28	0/67	0/48	0/65	1/00							
G08	0/52	0/39	0/49	0/42	0/41	0/37	0/36	1/00						
G09	0/52	0/50	0/35	0/80	0/54	0/60	0/58	0/45	1/00					
G10	0/77	0/75	0/36	0/52	0/81	0/50	0/45	0/43	0/56	1/00				
G11	0/60	0/70	0/34	0/67	0/79	0/58	0/53	0/36	0/62	0/70	1/00			
G12	0/51	0/60	0/33	0/42	0/56	0/49	0/44	0/41	0/47	0/61	0/53	1/00		
G13	0/54	0/50	0/46	0/48	0/52	0/50	0/45	0/48	0/51	0/58	0/52	0/60	1/00	
G14	0/57	0/53	0/35	0/50	0/63	0/52	0/53	0/37	0/48	0/61	0/65	0/65	0/48	1/00



شکل 2 نمودار دو سویه به منظور تعیین تعداد مناسب گروه‌ها (K=2) در ژنوتیپ‌های یونجه یک‌ساله مورد مطالعه



شکل 3 گروه‌بندی 14 ژنوتیپ یونجه یک‌ساله براساس روش بیزین در نرم‌افزار STRUCTURE براساس 71 مکان‌ژنی. هر رنگ یک زیرجمعیت یا گروه را نشان می‌دهد. اعداد روی محور افقی و عمودی به ترتیب شماره ژنوتیپ و ضریب تعلق هر ژنوتیپ به هر گروه را نشان می‌دهد.

با توجه به تغییرات مقدار ΔK به ازای تعداد مختلف گروه‌ها (K) [19] (شکل 2) و حداکثر بودن منحنی در K=9، ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در 9 گروه قرار گرفتند. تجزیه ساختار جمعیت به زیرجمعیت‌ها (شکل 3)، شناسایی ژنوتیپ‌های اختلاط‌یافته را امکان‌پذیر می‌سازد [24].

جدول 4، درصد عضویت 14 ژنوتیپ مورد مطالعه یونجه یک‌ساله به هر یک از زیرجمعیت‌ها را نشان می‌دهد. با توجه به جدول 4 و شکل 3، بیشترین اختلاط در ژنوتیپ‌های TN1.21 (تونس)، TN6.18 (تونس)، A10 (استرالیا)، F83005-5 (فرانسه)، SA22322 (سوریه)، A20 (استرالیا) و DZA315-16 (الجزایر) وجود دارد. زیرا با توجه به بارپلات حاصل از نرم‌افزار STRUCTURE (شکل 3) و درصد عضویت هر یک از ژنوتیپ‌ها در زیر گروه‌ها، وقتی درصد عضویت ژنوتیپ کمتر از مقدار 0/7 باشد، به عنوان ژنوتیپ ترکیبی (مخلوط شده) تعریف می‌شود (Spataro et al., 2011). وجود ساختار در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بیانگر اهمیت استفاده از ماتریس ساختار جمعیتی در مطالعات مرتبط با مکان‌یابی ارتباطی در ژرم‌پلاسم یونجه است تا بتوان درصد خطاهای مثبت را کاهش داد.

4- نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش بیانگر کارایی بالای نشانگرهای ISSR در ردیابی تنوعات ژنتیکی موجود در جنس یونجه و بویژه یونجه یک‌ساله *M. truncatula* می‌باشد. در این پژوهش، فاصله ژنتیکی ژنوتیپ‌ها با فواصل جغرافیایی آنها مطابقت نداشت. کمترین شباهت (25 درصد) بین ژنوتیپ TN8.3 (تونس) با TN6.18 (تونس) و بیشترین شباهت (0/82) بین دو ژنوتیپ TN8.3 (تونس) و SA28064 (مصر) بدست آمد.

جدول 4 درصد عضویت ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در زیر گروه‌های شناسایی شده با استفاده از نرم‌افزار STRUCTURE و براساس 71 مکان‌ژنی شناسایی شده توسط آغازگرهای ISSR

ژنوتیپ	گروه 1	گروه 2	گروه 3	گروه 4	گروه 5	گروه 6	گروه 7	گروه 8	گروه 9
G01	0/047	0/575	0/031	0/035	0/057	0/141	0/054	0/058	0/003
G02	0/002	0/881	0/000	0/003	0/001	0/112	0/001	0/001	0/000
G03	0/002	0/000	0/398	0/432	0/001	0/001	0/000	0/001	0/165
G04	0/000	0/000	0/000	0/000	0/000	0/000	0/196	0/000	0/804
G05	0/001	0/880	0/000	0/003	0/001	0/112	0/001	0/001	0/000
G06	0/023	0/005	0/001	0/006	0/017	0/007	0/224	0/023	0/693
G07	0/015	0/006	0/000	0/004	0/012	0/005	0/220	0/015	0/723
G08	0/123	0/000	0/646	0/002	0/094	0/057	0/006	0/072	0/000
G09	0/001	0/000	0/000	0/001	0/002	0/001	0/196	0/002	0/797
G10	0/003	0/865	0/004	0/005	0/003	0/112	0/004	0/003	0/000
G11	0/022	0/800	0/001	0/020	0/022	0/092	0/022	0/021	0/000
G12	0/122	0/059	0/089	0/099	0/187	0/187	0/087	0/159	0/012
G13	0/161	0/014	0/064	0/105	0/148	0/144	0/172	0/180	0/013
G14	0/115	0/066	0/072	0/092	0/200	0/177	0/099	0/168	0/011

تجزیه ساختار جمعیت نیز بیانگر وجود اختلاط در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بود. تنوع ژنتیکی شناسایی شده در این مطالعه، بیانگر ارزشمند بودن ذخایر ژنتیکی این گونه گیاهی و لزوم توجه بیشتر در حفظ، نگهداری، ارزیابی و شناسایی آنها می‌باشد.

5- منابع

[1] Diwan N, Bhagwat AA, Bauchan GB, Cregan PB (1997). Simple sequence repeat DNA markers in alfalfa and perennial and annual Medicago species. Genome, 40:887-895.

[2] Callum JB, Dixon RA, Farmer AD, Flores HR, Inman JT, Gonzales RA, Harrison MJ, Paiva NL, Scott AD, Weller JW, May GD (2001). The Medicago Genome Initiative: a model legume database. Nuclic Acids Research, 29:114-117.

[3] Tang H, Krishnakumar V, Bidwell S, Rosen B, Chan A, Zhou S, Gentzbittel L, Childs KL, Yandell M, Gundlach H, FX Mayer K, Schwartz DC, Town CD (2014). An improved genome release (version Mt4.0) for the model legume *Medicagotruncatula*. BMC genomics, 15:312.

[4] Abdollahi Mandoulakani B (2014). Study of genetic diversity in some populations of cultivated alfalfa (*Medicago sativa* L.) using morphological traits. Modern genet., 7:381-388.

[5] Beckmann JS, Soller M (1983). Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: methodologies, mapping and costs. Theoretical and Applied Genetics, 67: 35-43.

[6] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics, 20:176-183.

[7] Pradeep Reddy M, Sarla N, Siddiq EA (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. Euphytica, 128:9-17.

[8] Prevost A, Wilkinson MJ (1999). A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. Theoretical and Applied Genetics, 98:107-112.

[9] Chen JM, Gituru WR, Wang YH, Wang QF (2006). The extent of locality and genetic diversity in the rare *Caldesiagrandis* (Alismataceae): comparative results for RAPD and ISSR markers. Aquatic Botany, 84:301-307.

[10] Akritidis P, Mylona PV, Tsaftaris AS, Polidoros AN (2009). Genetic diversity assessment in Greek *Medicagotruncatula* genotypes using microsatellite markers. Biological Plantarum, 53:343-346.

[11] Falahati-Anbaran M, Habashi AA, Esfahany M, Mohammadi SA, Ghareyazie B (2006). Study of genetic diversity and relationships of diploid and tetraploid annual medics using microsatellite markers. Journal of Scientific and Technological Agriculture and Natural Resources, 10:349-359.

[12] Segovia-Lerma A, Cantrell RG, Conway JM, Ray IM (2003). AFLP-based assessment of genetic diversity among nine alfalfa germplasms using bulk DNA templates. Genome, 46:51-58.

[13] Abdollahi Mandoulakani B, Piri Y, Darvishzadeh R, Bernoosi I, Jafari M (2012). Retroelementinsertional polymorphism and genetic diversity in *medicago sativa* populations revealed by IRAP and REMAP markers. Plant Molecular Biology Reporter, 30:286-296.

[14] Azizi H, Bernoosi I, Abdollahi Mandoulakani B, Darvishzadeh R (2011). Study of genetic structure and diversity in cultivated alfalfa populations (*Medicago sativa* L.) using ISSR markers. Modern Genetic, 6:61-69.

[15] Doyle J, Doyle J, (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin, 19:11-15.

[16] Laurentin H (2009). Data analysis for molecular characterization of plant genetic resources. Genetic Research and Crop Evolution, 56:277-292.

[17] Rohlf FJ (1998). NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.02. Exter Software, Setauket, New York.

[18] Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics, 155:945-959.

[19] Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005). Detecting the number of clusters of individuals

using the software structure: a simulation study. Molecular Ecology, 14:2611-2620.

[20] Garayalde AF, Poverene M, Cantamutto M, Carrera AD (2011). Wild sunflower diversity in Argentina revealed by ISSR and SSR markers: an approach for conservation and breeding programmes. Annals of Applied Biology, 158:305-317.

[21] Mohsenzadeh Golfezani M, Samizadeh Lahiji H, Alami A, Shoadeilami M, TaleshSasani S (2012). Genetic diversity of several flue cured tobacco genotypes using ISSR and Retro-transposon markers. Iranian Journal of Field Crop Science, 43:371-380.

[22] Tagizad A, Ahmadi J, Haddad R, Zarrabi M (2011). Genetic diversity of Iranian Pistacia using some ISSR markers. Journal of Horticultural Science, 25:453-460.

[23] Jaccard P (1908). Nouvelles rescherchessur la distribution florale. Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles, 44:223-270.

[24] Dadras AR (2012). Evaluation of genetic diversity of tobacco (*Nicotianatabacum* L.) cultivars using AFLP molecular markers. ShahidBahonar University of Kerman. M. Sc. Thesis.