ارزیابی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های بومی یونجه ایران با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره ESTs

مسعود بهار[۱]، سیروس قبادی[۱]، وحید عرفانی مقدم[۱]، احد یامچی[۱]، مجید طالبی بداف[۱]، محمد مهدی کابلی[۲] و علی اکبر مختارزاده[۲]

چکیده

به منظور تعیین تنوع ژنتیکی بین برخی توده‌های بومی یونجه زراعی، شش جمعیت ایرانی بمی، رهنانی، نیک شهری، همدانی (از منطقه اصفهان)، همدانی (ازمنطقه شیراز)، یزدی و یک جمعیت رنجر آمریکایی با ۲۴ جایگاه ریز ماهواره طراحی شده از مناطق Expressed Sequence Tags (ESTs) گیاه *Medicago truncatula* و سه جایگاه ریز ماهواره‌ای شناسایی شده از کتابخانه ژنومی *M. sativa* ارزیابی شدند. بر اساس نتایج تکثیر باندهای مورد نظر و میزان چند شکلی، از بین آغازگرهای به کار رفته چهار جایگاه EST-SSR (AW9, BEE, TC6, TC7) و یک جایگاه ریز ماهواره ژنومی (AFct32) برای تخمین تنوع ژنتیکی میان جمعیت‌های یونجه مورد بررسی مناسب تشخیص داده شدند. در مجموع ۴۶ آلل برای این جایگاه‌ها در جمعیت‌های یونجه ردیابی شد. تعداد آلل‌های هر جمعیت در هر جایگاه از شش تا یازده متغیر بود و شاخص تنوع ژنتیکی جایگاه‌ها در میان جمعیت‌ها از ۰/۶۲ تا ۰/۸۷ برآورد شد. تجزیه و تحلیل روابط ژنتیکی بر اساس اطلاعات EST-SSR، جمعیت رنجر آمریکایی را به طور کامل از جمعیت‌های یونجه ایرانی متمایز نمود. بنابراین به نظر می‌رسد که والدین این یونجه متفاوت از جمعیت‌های ایرانی باشد. بر اساس دندروگرام رسم شده، جمعیت‌های یونجه ایرانی به دو گروه اصلی تقسیم شدند. ارقام سردسیری همدانی و رهنانی در یک گروه و ارقام گرمسیری بمی، یزدی و نیک شهری در گروه دیگر قرار گرفتند. موقعیت مناطق ریز ماهواره‌های EST در ناحیه کد شونده ژنوم، احتمالاً قابلیت استفاده از این نوع نشانگرها را برای روشن کردن روابط بین جمعیت‌های یونجه افزایش می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: یونجه، ریز ماهواره، EST(Expressed Sequence Tags)، تنوع ژنتیکی

مقدمه

یونجه (*Medicago sativa*) به عنوان یک گیاه دائمی از خانواده لگومینوز، مهم‌ترین گیاه علوفه‌ای برای تغذیه دام است که پس از غلات، مهم‌ترین محصول اقتصادی در دنیا محسوب می‌شود. از طرف دیگر همزیستی یونجه با باکتری‌های ریزوبیوم هم‌زیست و در نتیجه تثبیت نیتروژن ملکولی در این گیاه،

۱. به ترتیب استادیار، مربی، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشجویان دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

۲. پژوهشگران مرکز تحقیقات کشاورزی، استان اصفهان

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1385.10.2.11.3]

اهمیت آن را برای تناوب با محصولات زراعی دیگر برای حاصلخیزی خاک زیادتر کرده است، بنابراین در کشاورزی پایدار نیز نقش اساسی دارد.

خاستگاه اصلی یونجه، خاور نزدیک و آسیای مرکزی است که شمال غربی ایران را در بر می‌گیرد (۴). تاکنون نیز گونه‌های مختلفی از جنس *Medicago* در ایران شناسایی شده‌اند (۳) که به طور عمده به دلیل یکساله بودن و یا اقتصادی نبودن، کشت آنها به عنوان گیاهان زراعی مورد توجه نبوده و مانند سایر کشورهای دنیا فقط گونه *M. sativa* در اکثر مناطق ایران به عنوان یک محصول علوفه‌ای چند ساله کشت و کار می‌شود.

یونجه یک گیاه آتوتتراپلوئید (۲n =۴x =۳۲) آلوگامی است که به دلیل خوداناسازگاری، فقط حدود ۲۰ تا ۵۰ درصد خودگشنی دارد(۲۶). معمولاً گیاهان حاصل از خودگشنی به خاطر جمع شدن ژن‌های زیان آور در یک نسل، تولید بذر کمتری داشته و بوته‌های به دست آمده نیز رشد مناسبی ندارد. از طرف دیگر به خاطر میزان زیاد دگرگشنی (که بر حسب ژنوتیپ و شرایط محیط متغیر است) و گرده افشانی باز، یونجه گیاه بسیار هتروزیگوتی است که تنوع ژنتیکی زیادی در بین ارقام آن دیده می‌شود(۳۰). چنین تنوع ژنتیکی در گیاهان داخل یک توده یونجه که در اقلیم‌های مختلف جغرافیایی رشد می‌کنند نیز وجود دارد (۱۷). بنابراین به کارگیری اصطلاح اکوتیپ (Ecotype) برای توده‌های محلی یونجه که در شرایط آب و هوایی مختلف کاشته می‌شوند مصطلح است. وجود چنین اختلاف ژنتیکی گسترده در بین افراد جمعیت یونجه که به دلیل دگرگشنی و تتراپلوئید بودن آن اتفاق می‌افتد، مطالعات مربوط به ژنتیک جمعیت این محصول را پیچیده‌تر نموده است و به همین سبب پیدا کردن اطلاعات لازم در مورد تنوع ژرم پلاسم ارقام مختلف، مخصوصاً زمانی که از منابع مختلف جمع آوری شده باشند، اهمیت اساسی دارد (۲۸). درک تغییرات ژنتیکی و تنوع ارقام محلی یونجه و مشخص نمودن خصوصیات مهم زراعی آنها، فرصتی ایجاد خواهد کرد که اصلاح کنندگان یونجه با توجه به شاخص‌های مورد نظر خود به اصلاح این محصول مهم با دقت و آگاهی بیشتر بپردازند. چنین بررسی‌هایی مخصوصاً در ایران که به عنوان یکی از رستنگاه‌های اولیه یونجه منظور شده است و توده‌های محلی متنوعی دارد، مهم است.

مطالعه تنوع ارقام یونجه بر اساس خصوصیات ریخت شناسی و حتی بافت شناسی به زمان طولانی نیاز دارد و نیز به دلیل تأثیرپذیری خصوصیات مورفولوژیکی از شرایط محیطی، معمولاً این نوع بررسی‌ها دقیق نیست، بنابراین در سال‌های اخیر برای تعیین تنوع ژنتیکی ژرم پلاسم‌های یونجه از روش‌های مولکولی مختلفی استفاده شده است. نشانگر RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) از جمله روش‌های مرسوم ملکولی است که به منظور تجزیه و تحلیل جمعیت‌های یونجه برای آگاهی از امکان اختلاط جمعیت این محصول با گونه‌های دیگر جنس *Medicago* (۲۷)، تخمین روابط ژنتیکی بین جمعیت‌های مختلف (۱۵) و حتی تهیه نقشه ژنتیکی یونجه (۱۸)؛ مورد توجه بوده است. اما استفاده از نشانگر RAPD برای بررسی ژنتیک جمعیت اکوتیپ‌های یونجه اطلاعات زیادی را نشان نداده و به این جهت، مناسب شناخته نشده است (۲۲). در موارد دیگر روشRFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) برای تعیین تغییرات ژنتیکی بین جمعیت یونجه‌های دیپلوئید و تتراپلوئید استفاده شده است (۱۱ و ۳۴). نشانگر AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) نیز برای ارزیابی ارقام یونجه (۷) و تعیین نقشه ژنتیکی آن (۶) کاربرد داشته است. علی‌رغم سودمندی روش‌های ذکر شده برای تفکیک تفاوت‌های ژنتیکی جمعیت‌های یونجه، یا به دلیل گران بودن امکانات این روش‌ها و یا پیچیدگی مراحل اجرایی هر روش، نشانگرهای SSRs (Simple Sequence Repeats) که ریز ماهواره (Microsatellites) نیز نامیده می‌شوند به دلیل سرعت، دقت، ماهیت همبارز و سهولت کار برای تفکیک جمعیت‌های یونجه، توجه بیشتری را جلب نموده‌اند (۱، ۱۷ و ۲۸).

ریز ماهواره‌ها واحدهای نوکلئوتیدی دو، سه، چهار تا

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1385.10.2.11.3]

ده‌تایی تکرار شونده‌ای مانند $(AT)_n$ و یا $(CTT)_n$ هستند که در طول ژنوم موجودات یوکاریوت مانند گیاهان به طور فراوان یافت می‌شوند و به دلیل داشتن تعداد متفاوت، واحدهای تشکیل دهندهٔ چندشکلی زیادی را نشان دهند. به دلیل متغیر بودن بیش از حد جایگاه‌های ریز ماهواره که آلل‌های فراوان در هر جایگاه تولید می‌کنند، این نشانگرها ابزار مناسبی برای تشخیص ملکولی افراد هستند (۱۲). در واقع ریز ماهواره‌ها نشانگرهایی برای تعیین روابط بین افراد می‌باشند که به صورت همبارز (Codominant) صفات قابل تفکیک را از والدین به ارث می‌برند و به همین جهت وسیله‌ای کارآمد برای فهم رفتارهای تولید مثلی و ساختار جمعیت محسوب می‌شوند. از آنجایی که توالی نوکلئوتیدی نواحی دو طرف مجاور ریز ماهواره در ژنوم (Flanking region) معمولاً به صورت حفاظت شده (Conserved) برای هر موجودی می‌باشد، بنابراین می‌توان با طراحی آغازگرهای (Primers) اختصاصی از توالی‌های اطراف ریز ماهواره و از طریق سیستم واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، چند شکلی ریز ماهواره‌ها را در موجودات مختلف تعیین نمود و با توجه به اندازه طولی آنها تفاوت بین جنس‌ها، گونه‌ها و حتی ارقام را مشخص کرد (۳۳). تاکنون ریز ماهواره‌های زیادی را در محصولات مختلف گیاهی مانند گندم (۳۷)، برنج (۵)، سویا (۳۸)، گوجه فرنگی (۴۵) و گلابی (۴۶) شناسایی نموده‌اند که برای تفکیک گونه‌ها و ژنوتیپ‌های این گیاهان استفاده شده است.

گرچه ریز ماهواره‌های معرفی شده برای گیاهان از طریق کتابخانه ژنومیک (Genomic library) اکثراً ناشناس هستند ولی در سال‌های اخیر، ریز ماهواره‌هایی از طریق کتابخانه ژنومی به روش CDNA (Complimentary DNA) برای گیاهان شناسایی شده‌اند که از بخش‌های بیان شده ژنومی به دست آمده و EST-SSR (Expressed sequence tags) نامیده می‌شوند. این نوع ریز ماهواره‌ها به دلیل داشتن ضریب یکسانی (Probability of identity) کم، قدرت تفکیک بسیار بالایی دارند و چون مستقیماً چند شکلی را در مناطق رونویسی شونده نشان می‌دهند، در نتیجه تخمین دقیق‌تری از تنوع عملکردی را فراهم می‌کنند که احتمالاً در برنامه‌های اصلاح نباتات و بررسی منابع ژنتیکی ارزش بیشتری خواهند داشت (۱۹). چون طراحی آغازگرهای ریز ماهواره نیازمند جداسازی جایگاه‌ها و تعیین توالی‌های احاطه کننده ترتیب‌های ریز ماهوارهای است که عمل به آن بسیار پرهزینه و وقت گیر است؛ بنابراین برای افزایش استفاده از ریز ماهواره‌ها، به دلیل حفاظت شدگی (Conservation) توالی‌های احاطه کننده جایگاه‌های ریزماهواره، احتمال استفاده از این نشانگرها در بین گونه‌های نزدیک و یا حتی دور مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. مطالعات نشان داده است که توالی نوکلئوتیدی نواحی احاطه کنندهٔ جایگاه‌های ریز ماهواره در گونه‌ها و حتی جنس‌های داخل خانواده‌های گیاهی مانند گیاهان خانواده کلم (۲۴) و مرکبات (۲۳) حفاظت شده‌اند و این ریز ماهواره‌ها می‌توانند به عنوان نشانگرهای مشترک بین جنس‌های مختلف این خانواده‌های گیاهی استفاده شوند. در سال‌های اخیر نیز تعیین چند شکلی بین ارقام گلابی با ریز ماهواره‌های طراحی شده برای سیب (۴۶)، EST-SSR نیشکر در سورگوم (۱۴)، قابل استفاده بودن نشانگرهای ریز ماهواره نخودفرنگی (*Vicia* sp.) برای تکثیر جایگاه‌های ریز ماهواره‌ای عدس (*Lens culinaris*) نیز تأیید شده است (۳۲).

به غیر از مثال‌های مزبور که نشان دادند امکان استفاده از ریز ماهواره‌های یک گونه گیاهی به عنوان نشانگر ملکولی برای تعیین سطح چند شکلی درون و میان جمعیت‌های گونه‌های نزدیک به آن گیاه وجود دارد، احتمال استفاده از ریز ماهواره‌های یونجه زراعی *M. sativa* در طیفی از گونه‌های یک ساله و چندساله جنس (*Medicago*) نیزآزمایش شد. نتایج نشان داد که ریز ماهواره‌های طراحی شده از کتابخانه ژنومی یونجه می‌توانند برای ارزیابی روابط ژنتیکی، خویشاوندی‌های تاکسونومی و تشخیص‌های ژنوتیپی گونه‌های مختلف *Medicago* استفاده شوند (۱۷). نشانگرهای ریزماهواره‌ای در مقایسه با صفات مورفولوژیکی برای پیش‌بینی هتروزیس در

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1385.10.2.11.3]

تلاقی بین *M. sativa* subsp. *sativa* و *M. sativa* subsp. *falcata* به کار گرفته شدند (۳۵). هم‌چنین با استفاده از چنین آغازگرهایی، تعدادی از توده‌های بومی یونجه ایرانی از مناطق یزد، اصفهان، کرمان، خراسان، لرستان و همدان از نظر تنوع ژنتیکی مورد بررسی قرار گرفتند (۱). اخیراً نیز عرفانی (۲) نشان داد که از میان ۴۷ جفت آغازگر EST-SSR متعلق به *M. truncatula*، ۳۰ جفت آغازگر در یونجه حفاظت شده و می‌توان از آنها برای مطالعات تنوع ژنتیکی بین توده‌های یونجه معمولی استفاده نمود.

با توجه به ذخایر ژرم پلاسم یونجه در ایران و وجود ارقام محلی در کشور، بررسی و تعیین سطح تنوع ژنتیکی آنها توسط روش‌های ملکولی ضروری به نظر می‌رسد. به لحاظ دقت و چند شکلی قابل توجه نشانگرهای ریزماهواره (۱۷ و ۲۸) و نیز به لحاظ اثبات کارآیی آغازگرهای EST-SSR متعلق به *M. truncatula* در تعیین تنوع ژنتیکی یونجه (۲)، طی این پژوهش استفاده از نشانگرهای ریز ماهواره برای تعیین سطح تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های مختلف از یونجه زراعی ایران برای آگاهی از وضعیت ژنتیکی این ذخایر توارثی برای به دست آوردن حداکثر هتروزیس در برنامه‌های اصلاحی تهیه ارقام برتر، مورد توجه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و استخراج DNA

نمونه‌های گیاهی از پنج توده یونجه بومی همدانی، رهنانی، یزدی، بمی، بغدادی و یک توده یونجه آمریکایی رنجر که در ایستگاه تحقیقاتی شهید فزوه اصفهان کشت شده بودند جمع آوری شد. یک توده یونجه همدانی نیز از مزرعه دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز- باجگاه در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفت. از هر توده یونجه ۲۸ نمونه گیاه و از هر گیاه یک ساقه دارای پنج برگ جوان انتهایی انتخاب شد و در یخدان کائوچویی به آزمایشگاه منتقل شد. پس از ثبت مشخصات، نیم گرم از هر نمونه گیاهی به طور جداگانه به وسیله ازت مایع منجمد شده و تا زمان استخراج DNA در فریزر $-80^{\circ}C$ نگه‌داری شد.

استخراج DNA از نمونه‌های جمع آوری شده طبق روش دلاپورتا (۱۶) انجام گرفت. به این منظور پس از پودر کردن نمونه‌های برگی در حضور ازت مایع، مقدار ۶۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج (100 mM Tris-HCl pH 8.0، 50mM EDTA pH 8.0، 500mM NaCl، 1.25% (W/V) SDS) به آن اضافه شده و بعد از مخلوط کردن به مدت ۳۰ دقیقه، در حمام آب گرم $60^{\circ}C$ با تکان دادن به صورت وارونگی در هر پنج دقیقه، نگه‌داری شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از استات پتاسیم پنج مولار به هر نمونه اضافه و بعد از حدود پنج ثانیه ورتکس کردن به مدت ۱۵ دقیقه بر روی یخ نگه‌داری شد. پس از استخراج با مخلوط کلروفورم- ایزوآمیل الکل (۲۴:۱)، مایع رویی انتخاب و DNA موجود در هر نمونه با ایزوپروپانل سرد، رسوب داده شد. توده DNA پس از شستشو با الکل ۷۰ درصد خشک و سپس در ۷۰۰ میکرولیتر بافر TE حل گردید. بعد از اضافه کردن سه میکرولیتر RNaseA (10 mg/ml) تهیه شده از شرکت Sigma، نمونه‌ها به مدت یک ساعت در $37^{\circ}C$ نگه‌داری شدند و سپس دو بار استخراج با کلروفورم- ایزوآمیل الکل صورت گرفت. به محلول مایع رویی، ۰/۱ حجم اصلی استات سدیم سه مولار (pH ۴/۸) و دو حجم اتانل سرد اضافه شد و پس از سانتریفوژ در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه (5810R Eppendorf centrifuge) به مدت ۱۵ دقیقه، رسوب DNA به دست آمد. بعد از دو بار شستشو با الکل ۷۰ درصد و خشک شدن در شرایط خلاء در ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل دو بار تقطیر حل شد. غلظت DNA هر نمونه پس از سنجش کیفی و کمی با اسپکتروفتومتر (Beckman DU 530) تحت تابش اشعه ماورای بنفش، با آب مقطر استریل در حدود ۲۵ نانوگرم در میکرولیتر تنظیم شد.

تکثیر ریز ماهواره‌ها

جفت آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر جایگاه‌های ریز

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1385.10.2.11.3]

ماهواره‌ای توده‌های یونجه در این پژوهش از دو منبع مختلف تهیه شد. سه جفت آغازگر مربوط به جایگاه‌های ریز ماهواره AFctt1، AFct32 و AFca11 که از کتابخانه ژنومی یونجه تهیه شده بودند (۱۷) توسط شرکت آلمانی TIB MOLBIOL سنتز شده و پس از رقیق شدن در حد ۲۰ پیکومول در هر میکرولیتر در آزمایش‌های به کار رفت. هم‌چنین ۲۴ آغازگر طراحی شده از مناطق مجاور ریز ماهواره شناسایی شده از کتابخانه‌های مختلف cDNA که حفاظت شدگی توالی آنها برای تکثیر نواحی ریز ماهواره‌ای یونجه به روش PCR تأیید شده بود (۲) مورد استفاده قرار گرفت (اهدایی دکتر داریوش دانش – دانشگاه مینه سوتا–آمریکا). مشخصات تمام جفت آغازگرهای مورد بررسی در جدول ۱ ذکر شده است.

انجام واکنش PCR

واکنش PCR برای نمونه‌ها در حجم ۱۵ میکرولیتری شامل ۱/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X حاوی کلریدمنیزیم ۱۵ میلی مولار، یک واحد *Taq* DNA polymerase (Roche Co., Germany)، ۰/۳۳ میکرومولار از هر آغازگر، ۰/۲ میلی مولار dNTPs (Roche Co., Germany) و ۵۰ نانوگرم DNA ژنومی از هر نمونه تهیه شد. پس از اضافه کردن یک قطره روغن معدنی استریل به هر نمونه، لوله‌ها در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf master gradient) قرار گرفت که در آن انجام واکنش PCR به صورت یک چرخه واسرشت سازی اولیه (Denaturing) در $94^{\circ}C$ به مدت ۴ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشت سازی ثانویه در $94^{\circ}C$ به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها به رشته DNA (Annealing) در $52^{\circ}C$ به مدت ۴۵ ثانیه و بسط قطعات DNA سنتز شده (Extention) در $72^{\circ}C$ به مدت ۹۰ ثانیه و یک چرخه بسط نهایی در $72^{\circ}C$ به مدت ۱۰ دقیقه، برنامه ریزی شده بود. با توجه به طول و نسبت G+C آغازگرها، بر اساس اطلاعات به دست آمده از نرم افزار کامپیوتری Oligo calculator (http://www.basic.nwu.edu/biotools/oligocalc.html) دمای اتصال برای آغازگرهای BEE و TC6، $54^{\circ}C$ در نظر گرفته شد.

از هر نمونه از محصولات PCR به دست آمده، مقدار پنج میکرولیتر انتخاب شده و به نسبت حجم مساوی با بافر بارگذاری (۹۵ درصد Formamide، ۰/۰۵ درصد Bromophenol blue، ۰/۰۵ درصد Xylene cyanol و ۱۰ میلی‌مولار EDTA) مخلوط شد. مقدار پنج میکرولیتر از مخلوط هر نمونه در یک چاهک ژل پلی اکریل آمید ۶ درصد واسرشت حاوی ۷ مولار اوره (دستگاه Atto مدل AE-6220) بارگذاری شد و به مدت دو ساعت با ولتاژ ثابت ۲۰۰ الکتروفورز گردید. جهت نمایان کردن قطعات DNA در ژل از رنگ آمیزی به روش نیترات نقره (۸) استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری (نمره گذاری آلل‌ها و ارزیابی چندشکلی)

الگوهای باندی حاصل بر حسب حضور و یا عدم حضور باندها به صورت یک و صفر امتیاز دهی شد و تجزیه واریانس ملکولی با نرم‌افزار POPGENE 3.2 انجام گرفت (۴۷). بر اساس مقادیر Fst در مقایسه دو به دوی جمعیت‌ها با این نرم افزار، ماتریس عدم تشابه ساخته شد و با استفاده از ضریب نی و لی (۲۹) و توسط نرم افزار NT SYS-pc 2.02، تجزیه خوشه‌ای انجام و دندروگرام حاصل بر اساس روش UPGMA ترسیم شد. محتوای اطلاعات چند شکلی و یا شاخص تنوع (PIC) به وسیله فرمول پیشنهادی بوستین و همکاران [$1-\Sigma p_i^2$] محاسبه شد (۱۰). در این فرمول p_i فراوانی iامین آلل برای نشانگر i است و برای n آلل بسط داده می‌شود.

نتایج

از ۲۴ نشانگر تهیه شده از cDNA های مختلف گیاه *M. truncatula* که برای تعیین تغییرات میان جمعیت‌های یونجه استفاده شد، هشت جفت آغازگر: BE1، BE2، BEA، BEB،

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1385.10.2.11.3]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1385.10.2.11.3] [Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-04-19]

جدول ۱. مشخصات و اطلاعات مربوط به آغازگرهای ریز ماهواره‌ای مورد استفاده در این پژوهش

Locus	Accession no.	Forward primer	Reverse primer	Core motif	منبع	اندازه
AL2	AL374644	GGCATAACGTATCCGACACC	TCATCAATGGTCCACAGCAT	$(AT)_{22}$	ریشه- گیاه آلوده شده به *Sinorhizobium meliloti*	۳۱۴
AL5	AL386409	AACCTGGAGGAATGCACCTA	ATCGCAGAACGGCTTTAAGA	$(AT)_{13}$	ریشه- گیاه آلوده شده به مایکوریز *Glomus* sp.	۲۵۱
AW1	AW127339	AGAAGCATCACGTCTTGCAG	TTGGCATACAAAGGCACAAG	$(TA)_{14}$	برگ- گیاه آلوده شده به قارچ *Colletotricum trifoli*	۲۵۶
AW7	AW696663	TGAGGTTTTGGGCAAGAGTT	TCCAATCATCCCACACTTTG	$(TTC)_{14}$	ساقه- قطعات میان گره گیاه	۲۰۴
AW8	AW697393	TTGTTCGATCCATCATCATCA	CCAAGGTTCCATCTTCATCG	$(CA)_{10}$	ساقه- قطعات میان گره گیاه	۱۹۷
AW9	AW776153	TGGGTGGAGGAAATTACGAC	CCACATATGTTGCTGTTTCCA	$(CAA)_{11}$	برگ- گیاه آلوده شده به قارچ *Colletotricum trifoli*	۱۵۷
BE1	BE319577	GGCCAGCTGTGTAAAGACATTT	CCCCAACAACCACACAAAA	$(TA)_{27}$	ریشه- گیاه در حال نمو	۲۶۷
BE2	BE322149	TTGCATTGCTTCCCTTATTACA	CCCTTCTTCCTTTGTGTTCACT	$(TC)_{16}$	برگ- گیاه تغذیه شده با آفت *Spodoptera exiqua*	۲۶۰
BE5	BE322956	TCTCTAAAACTACCCGCCACTT	CCTCAGAATCAACAACGCTCT	$(CT)_{10}$	برگ- گیاه تغذیه شده با آفت *Spodoptera exiqua*	۲۸۰
BE6	BE323173	TTCGTTTCCCTCTCTCACTCA	AGTTTGATATGGGCTTGAGCA	$(CT)_{15}$	برگ- گیاه تحت تنش فسفات	۲۱۹
BE9	BE323955	CACACTCTCTCTTCTCCGGTTC	TGTCGTCAGTGGTGGTTGTTA	$(CT)_{13}$	برگ- گیاه تحت تنش فسفات	۲۳۶
BE11	BE324313	AAGAGGTTAAGTGCAAAAACACAA	GACCACACATCTTCTTCCATGA	$(TTA)_{11}$	برگ- گیاه تحت تنش فسفات	۲۴۱
BE15	BE325413	CATCGCTGTCGTTTTGTTTTT	ACTGCTTCTTTGATCCTGCAA	$(CT)_{10}$	ساقه- قطعات میان گره گیاه	۲۰۷
BE16	BE325495	CAGCCACATTTTGCTGTAAAGA	AGTAACCTTTGACCCCAGCAT	$(TC)_{10}$	ساقه- قطعات میان گره گیاه	۲۲۸
BEA	BE315997	GAAAGAAGATGGCGGTTTCA	ACGAGGTCTTGCATCTCAGG	$(CTT)_{11}$/ $(GAA)_5$	برگ- مخلوط برگ‌های جوان، بالغ و مسن گیاه	۲۴۷
BEB	BE316149	GGTGGTATTTTGAGTGATGAAGG	CCTAATGACCCCTCCTCTCC	$(GA)_{10}$	برگ- مخلوط برگ‌های جوان، بالغ و مسن گیاه	۲۵۸
BEC	BE316630	CACAGAGGCAACTCCTCACA	GGGTCATCTTGTTTTGTCTCC	$(CT)_{10}$	برگ- مخلوط برگ‌های جوان، بالغ و مسن گیاه	۲۶۱
BEE	BE317653	CACGAGGCACACTTCCATT	GTTGTTTGTGTCCCCAGGAG	$(TC)_{17}$	برگ- مخلوط برگ‌های جوان، بالغ و مسن گیاه	۲۵۰
BEF	BE318535	TCCTTCGTCTTTTCATTTTCTCA	TTCCAACCCTCTTGGACAAA	$(GGA)_5$	برگ- مخلوط برگ‌های جوان، بالغ و مسن گیاه	۲۴۴
TC1	TC10130	GGGTCAAAGAAAAAGCCAAC	GCAGACACAACTCAACTTGATACG	$(TTC)_{10}$	ساقه- گیاه در حال نمو	۲۱۲
TC2	TC11276	CCTTCGTCTTTTCATTTTCTCA	TTCCAACCCTCTTGGACAAA	$(CT)_{10}$	ریشه- گیاه آلوده شده به *Sinorhizobium meliloti*	۲۴۳
TC5	TC12008	ATGGTGGTAGCGGTAGCAGT	CACCCTTCGAACATCCATTT	$(ATT)_{16}$	ریشه- گیاه آلوده شده به *Sinorhizobium meliloti*	۲۳۰
TC6	TC12878	CACTCACACTCAACACACAACA	ACGCCTCTCTTTCCGATCTT	$(AG)_{12}$	ساقه- گیاه در حال نمو	۲۰۰
TC7	TC12985	CCAACATCCTTTTCCTTTCC	TTCTCTCCATACCTCGCTCAA	$(GAA)_{13}$	برگ- گیاه تغذیه شده با آفت *Spodoptera exiqua*	۲۰۹
AFct32	Diwan *et al*., 1997	TTTTTGTCCCACCTCATTAG	TTGGTTAGATTCAAAGGGTTAC	$(CT)_{14}$	از کتابخانه ژنومی	۱۲۷-۱۰۲
Afca11	Diwan *et al*., 1997	CTTGAGGGAACTATTGTTGAGT	AACGTTTCCCAAAACATACTT	$(CA)_{11}$	از کتابخانه ژنومی	۱۶۴-۱۳۸
Afctt1	Diwan *et al*., 1997	CCCATCATCAACATTTTCA	TTGTGGATTGGAACGAGT	$(CTT)_9$ $(CAA)_3$	از کتابخانه ژنومی	۱۲۲-۹۷

BEC، AW7، TC1 و TC5 قادر بـه تکثیـر جایگـاه مـورد نظـر نبودند که احتمالاً به خاطر متفاوت بودن توالی‌های احاطه کننده جایگـاه‌هـا (Flanking region) در یـک یـا دو جایگـاه اتـصال آغازگر بوده است. در بین این آغازگرها نـه (۹) آغـازگر (AL5، AW8، BE5، BE6، BE9، BE11، BE15، BEF و TC2) و دو آغـازگرطراحی شـده از کتابخانـه ژنـومی AFctt 1 و AFcal 1، باندهای یک شکل تولید نمودند. تنـوع آللـی آغازگرهـای-EST SSRشامل BE16 (دو آلل)، AW1 (سـه آلـل) و AL2 (چهـار آلل) چندشکلی نشان نداد که برای ارزیابی فواصل ژنتیکی بـین ژرم پلاسم‌ها سودمند باشد. در مقابل، آغازگرهای BEE با شش آلـل، TC7 بـا نـه آلـل، AW9 بـا ۱۱ آلـل و TC6 بـا ۱۱ آلـل، چندشـکلی بـسیار بـالایی را نـشان داد. تکثیـر جایگـاه‌هـای ریزماهواره یونجـه زراعـی بـا نـشانگرهای *M.truncatula*، کـه اندازه آلل‌ها تقریباً در دامنه مورد انتظار برای هـر جایگـاه بـود، امکان استفاده از این ریزمـاهواره‌هـای EST بـرای تعیـین تنـوع ژنتیکی میان جمعیت‌هـای یونجـه جمـع آوری شـده را فـراهم ساخت. اندازه مورد انتظار و فاصـله کـم آلـل‌هـا از همـدیگر و کیفیت خـوب باندها روی ژل، بیـانگر سـطح بـالای حفاظـت شدگی (Conservation) توالی‌های احاطـه کننـده جایگـاه‌هـای ریزماهواره *M. truncatula* در یونجـه زراعـی بـود کـه کارآمـد بودن این EST-SSRs را برای تولید چندشکلی در ژنوتیپ‌هـای یونجه تأیید می‌کند.

با در نظر گرفتن نتایج اولیه، چهار نشانگر EST-SSR شامل BEE، AW9، TC6 و TC7 به همراه نشانگر ریز ماهواره‌ای تهیه شده از کتابخانه ژنومی AFct32 با نه آلـل بـرای ارزیـابی تنـوع ژنتیکی میان جمعیت‌های یونجه مورد استفاده قرار گرفت که در مجمـوع ۴۶ آلـل ردیـابی شـد. بیـشترین ضـریب تنـوع (Diversity index) برای جمعیت‌هـای یونجـه در جایگـاه‌هـای AW9 (۰/۸۶)، TC7 (۰/۸۷) وکمتـرین آن در جایگـاه BEE (۰/۶۲) مـشاهده شـد. بیـشترین تنـوع آللـی نیـز مربـوط بـه جایگاه‌های TC6 و AW9 (۱۱ آلل) بود، در حـالی کـه جایگـاه BEE با شش آلل کمترین تنوع را داشت (جدول ۲).

تعداد آلل‌های موجود برای هر فرد در هر جایگاه از ۱ تا ۶ فرق می‌کرد ولی ۹۷٪ افراد ۳ تا ۴ آلل متفاوت داشتند کـه بـه خـاطر هتروزیگوسیتی و سطح پلویئدی، ارقام یونجه معمـولی بـود. دو آلل ۱۱۱ و ۱۰۷ در بین افراد جمعیت‌های یونجـه مـشترک بـود ولـی بعـضی آلـل‌هـا (۱۱۹، ۱۰۹، ۱۰۸ و ۹۳) در داخـل یـک جمعیت مشاهده شدند که در جمعیت‌های دیگر حضور نداشت (جدول ۲). اگرچه در این پژوهش ریز ماهواره‌های نشان دهنده پلی مورفیسم، نگاره‌های (motif) مختلف سه نوکلئوتیـدی و دو نوکلئوتیدی داشتند و تکرارهای هـر کـدام از آنهـا (طـول ریـز ماهواره) نیز متفاوت بود، ولی رابطه مشخصی بـین ایجـاد پلـی مورفیسم و تنوع آللی با تعداد نوکلئوتیدهای نگاره (دوتـایی یـا سه تایی) و نیز طول ریز ماهواره به دست نیامد.

در ارزیابی افراد داخـل جمعیـت یونجـه‌هـای بـومی، تنـوع ژنتیکی قابل توجهی به دست آمد. حداکثر این اختلاف ژنتیکـی در جمعیت یونجه همدانی جمع آوری شـده از شـیراز (۸۴٪) و حداقل آن نیز در جمعیت رنجر آمریکایی (۶۳٪) مـشاهده شـد. میزان تنوع ژنتیکی در جمعیت رهنـانی ۷۱٪، بمـی ۷۱٪، یـزدی ۷۳٪، نیک شهری ۷۷٪ و همدانی جمع آوری شـده از اصـفهان ۸۰٪ برآورد شد که وجـود ایـن تنـوع ژنتیکـی زیـاد در داخـل جمعیت‌های مورد بررسی به دلیل طبیعت دگرگشن و تتراپلوئید بودن یونجه قابل تصور است.

بر اسـاس دنـدروگرام بـه دسـت آمـده از روش UPGMA (شکل ۲)، جمعیت رنجر آمریکایی در یـک گـروه کـاملاً مجـزا قرار گرفت. دلیل این امر سینتتیک بـودن رقـم رنجـر اسـت، در صورتی که بقیه ارقام مورد بررسی توده‌هـای بـومی هـستند. بـا توجه به این دندروگرام، ارقام رهنانی و همدانی در یـک گـروه قرار گرفتند و جمعیت یونجه‌های یزدی و بمی با جمعیت نیـک شهری به یک گروه دیگر تعلق پیدا کرد. متفـاوت بـودن فاصـله ژنتیکی یونجه‌های یزدی، بمی و مخصوصاً نیک شهری (کـه در صورت منطقی بودن نامگذاری آنها باید جزو ارقـام سـازگار بـه مناطق گرمسیری محسوب شود)، از بقیه ارقام؛ به نحوی چنـین القا می‌کند که احتمالاً تغییرات ژنتیکی ارقام یونجه با تنوع مبـدأ

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-04-19]

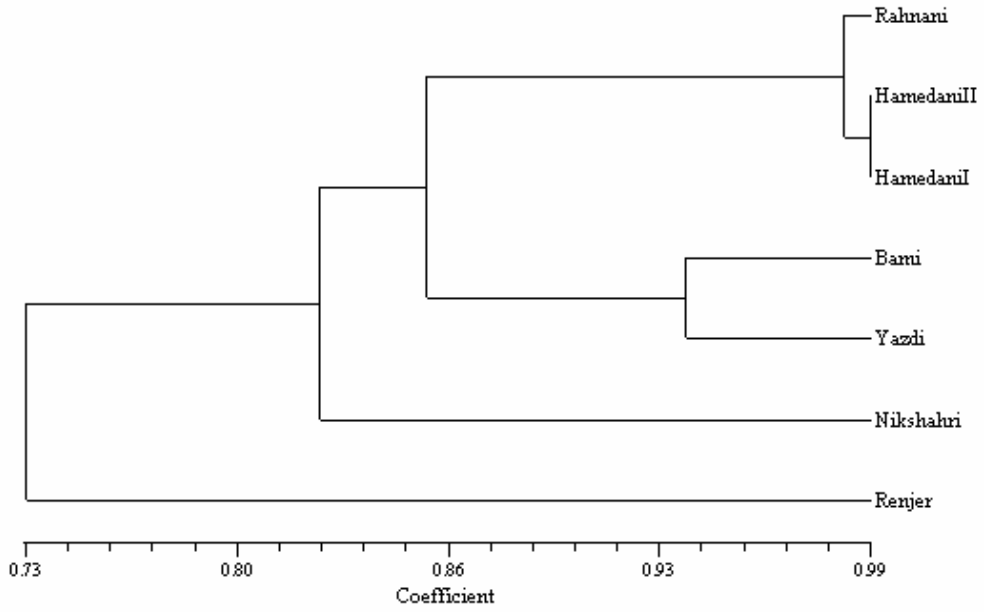
[DOR: 20.1001.1.22518517.1385.10.2.11.3]

جدول ۲. اندازه آللی بر مبنای جفت باز(bp)، تعداد و انواع آلل و شاخص تنوع جایگاه‌های ریز ماهواره‌ای مورد استفاده در ارزیابی ژنتیکی جمعیت‌های یونجه ایرانی و رنجر آمریکایی

آغازگر / اندازه آللی (bp)	AFct32	BEE	AW9	TC6	TC7	جمع
۱۲۵	۱۳	۰	۱۴	۸	۱۹	۵۴
۱۲۲	۱۰	۰	۶۴	۰	۷	۸۱
۱۱۹	۲	۰	۰	۰	۰	۲
۱۱۶	۶۳	۱	۲	۱۱۸	۰	۱۸۴
۱۱۱	۶۴	۱	۱۱	۱۲۷	۲۴	۲۲۷
۱۰۹	۱۲	۰	۰	۰	۰	۱۲
۱۰۸	۱۹	۰	۰	۰	۰	۱۹
۱۰۷	۶۴	۳۱	۱۰۶	۱۲۳	۱۲۰	۴۴۴
۱۰۰	۱۵۰	۲۰	۹۷	۷	۰	۲۷۴
۹۷	۰	۶۱	۱۳۲	۲۷	۱۲۴	۳۴۴
۹۵	۰	۱۳۷	۱۶۰	۱۰۶	۰	۴۰۳
۹۳	۰	۰	۰	۰	۱۱۹	۱۱۹
۹۰	۰	۰	۱۰۷	۱۴	۳۳	۱۵۴
۸۷	۰	۰	۲	۲	۰	۴
۸۶	۰	۰	۱۰	۲	۵۷	۶۹
۸۵	۰	۰	۰	۴	۱۸	۲۲
مجموع آل‌ها	۳۹۷	۲۵۱	۷۰۵	۵۳۸	۵۲۱	۲۴۱۲
تعداد آلل در هر جمعیت	۹	۶	۱۱	۱۱	۹	۴۶
شاخص تنوع ($1-\Sigma p_i^2$)	۰/۷۷	۰/۶۲	۰/۸۶	۰/۸۱	۰/۸۷	$\overline{X}$=۰/۷۸۶

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1385.10.2.11.3]



شکل ۲. دندروگرام مربوط به رابطه ژنتیکی جمعیت یونجه‌های ایرانی با جمعیت یونجه رنجر آمریکایی با استفاده از نشانگرهای ریز ماهواره‌ای

جغرافیایی آنها رابطه متناسبی دارد.

با وجودی که جمعیت‌های رقم همدانی از دو مکان متفاوت اقلیمی اصفهان و شیراز نمونه برداری شده بودند و حتی تفاوت‌های محدودی هم در بین افراد این جمعیت‌ها به دلیل هتروزیگوسیتی یونجه مشخص شد ولی شباهت بسیار زیاد آنها دلیل قانع کننده‌ای برای درستی نام نسبت داده شده به این ژنوتیپ ارائه داد و مشخص کرد که این جمعیت‌ها منشأ اجدادی مشترکی دارند.

بحث

حفاظت شدگی توالی‌های احاطه کننده جایگاه‌های EST-SSR گیاه *M.truncatula* در یونجه زراعی با تنوع آللی بالا و اندازه‌های یکسان این جایگاه‌ها، امکان آن را فراهم نمود که تنوع میان جمعیت‌های یونجه‌های جمع آوری شده ارزیابی شود. امکان تکثیر یک جایگاه در یک گونه توسط آغازگرهای ریز ماهواره‌ای گونه دیگر به صورت‌های متفاوت و در محصولات مختلف مانند یونجه (۱۷) نیشکر (۱۴) برنج (۱۳) گلابی (۴۶) و محصولات دیگر گزارش شده است. گر چه در استفاده از این آغازگرها باید توجه داشت که تولید چندشکلی با افزایش فاصله ژنتیکی گونه‌ها کاهش می‌یابد (۳۶)، اما نتایج استفاده از EST-SSR گیاه *M.trucatula* در تولید موفق تعداد زیادی آلل در یونجه زراعی مشخص نمود که این نشانگرها می‌توانند در تعیین مشخصات ژرم پلاسم‌های یونجه و حتی تهیه نقشه ژنتیکی آنها استفاده شوند. بعضی از محققین میزان چندشکلی ریزماهواره‌ها را در جایگاه‌های دو نوکلئوتیدی بیشتر از جایگاه‌های سه نوکلئوتیدی، می‌دانند (۳۸ و ۳۹) ولی در پژوهش حاضر چنین تفاوتی بین EST-SSRs مشخص نشد و هم ریز ماهواره‌های با نگاره دوتایی (TC7) و هم سه تایی (AW9) چندشکلی بالایی تولید کردند. هم‌چنین ریز ماهواره‌هایی با داشتن نگاره‌های دوتایی (AL5، BE5، BE15) و یا سه تایی (AW8، BEA، BEF) باند تک شکل تکثیر کردند و یا آلل کمتری تولید نمودند (BE16 و AW1). از طرف دیگر رابطه مشخصی بین تعداد تکرارهای نگاره‌ها (طول ریز ماهواره) و نیز تعداد آلل‌ها در بین افراد یک جمعیت و یا جمعیت‌های

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1385.10.2.11.3]

مختلف پیدا نشد. بعضی از پژوهشگران با در نظر گرفتن پدیده Slipped- strand mispairing (۲۵) در طی نسخه برداری DNA عنوان می‌کنند که با طویل‌تر بودن طول ریز ماهواره، میزان چندشکلی افزایش می‌یابد (۲۱، ۴۲ و ۴۳). در واقع به دلیل احتمال زیاد وقوع موتاسیون در ریز ماهواره‌های بلند و نواحی مجاور آنها نسبت به ریز ماهواره‌های کوتاه، ریز ماهواره‌های با تعداد تکرار نگاره زیاد در تمایز ژنوتیپ‌ها و ارقام، قدرت بیشتری دارند (۴۲) البته چنین وضعیتی برای EST-SSR مورد استفاده در تفکیک ارقام یونجه در این پژوهش مشخص نشد.

در ارزیابی افراد جمعیت‌های مورد مطالعه، سطح هتروزیگوسیتی جمعیت‌های یونجه بومی ایران نسبت به جمعیت رنجر آمریکایی بالاتر بود که نشان می‌دهد یونجه‌های ایرانی به دلیل این که در برنامه‌های اصلاح نباتات قرار نگرفته‌اند، زمینه ژنتیکی متنوع تری دارند و می‌توان از آنها برای انتخاب ژنوتیپ‌های متنوع به منظور تولید ارقام جدید استفاده کرد. چندشکلی آللی کمتر در جمعیت رنجر آمریکایی و نیز فاصله ژنتیکی مشخص آن از ارقام ایرانی (شکل ۲) گرچه بر سینتتیک بودن این رقم یونجه تأکید می‌کند، ولی به هر حال به نظر می‌رسد که خلوص اولیه بذر رنجر آمریکایی وارداتی در شرایط زراعی ایران تغییراتی پیدا کرده است و احتمالاً در طول زمان آتی به دلیل آمیختگی ژنتیکی بیشتر با ژنوتیپ‌های یونجه ایرانی تنوع بیشتری پیدا خواهد کرد.

ارقام یونجه مورد بررسی ایرانی با توجه به مبدأ جغرافیایی خود، فاصله ژنتیکی مشخص داشتند و به نظر می‌رسد ریز ماهواره‌های مورد استفاده به خوبی توانسته باشند تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای بین ارقام مناطق معتدل‌تر مانند همدانی و رهنانی با ارقام گرمسیری بمی، یزدی و نیک شهری مشخص نمایند. در صورتی که به توان با ارزیابی ژنوتیپ‌های بیشتر و متنوع‌تر از نظر اقلیمی این آزمایش‌ها را تکرار نمود، احتمالاً رابطه مناسبی بین تغییرات ژنتیکی ارقام با مبدأ جغرافیایی آنها پیدا خواهد شد که در شناسایی ارقام با زمینه‌های ژنتیکی متنوع و دارای فاصله دورتر ژنتیکی اهمیت دارد. چنین یافته‌هایی طبعاً آگاهی از وضعیت تنوع گیاهی در ایران را افزایش داده و اطلاعاتی را برای مدیریت نگه‌داری صحیح از این منابع متغیر ژنتیکی برای جلوگیری از انقراض ژرم پلاسم‌ها فراهم خواهد ساخت.

نزدیکی فواصل ژنتیکی ارقام همدانی و رهنانی نیز قابل توجه بود و مجدداً تأیید نمود که ژنوتیپ‌های متعلق به مناطق معتدل‌تر با ارقام گرمسیری مانند نیک شهری، زمینه‌های ژنتیکی مختلفی دارند که از آنها می‌توان برای ایجاد ارقام هیبرید جدید با هتروزیس بالا استفاده کرد. این مطلب با توجه به یافته‌های قبلی که تأکید می‌نماید، میزان هتروزیس بین جوامع از میزان هتروزیس داخل جوامع بیشتر است (۳۱) و هر چقدر والدین از نظر ژنتیکی و منطقه جغرافیایی دورتر باشند؛ دورگ‌های حاصل از تلاقی آنها دارای هتروزیس بیشتری خواهند بود (۲۰)؛ اهمیت دارد. بنابراین توجه به انتخاب والدین از میان جمعیت‌های نیک شهری و نیز همدانی یا رهنانی در برنامه اصلاح یونجه بومی را بیشتر یادآوری می‌کند. تأکید بر این مطلب از آن جهت اهمیت دارد که در این پژوهش، تعیین فاصله ژنتیکی ارقام یونجه بر اساس نشانگرهای EST-SSRs صورت گرفته است که از مناطق کد شونده ژنوم تهیه شده‌اند و می‌توانند فعالیت‌های بیولوژیکی و در ادامه تغییرات فنوتیپی را متمایز سازند (۱۹) به طوری که این اطلاعات به دست آمده، شباهت‌ها و تفاوت‌های ژنوم جمعیت‌ها را از نظر عملکرد ژن‌های آنها ارائه می‌دهد. ظاهراً در پدیده هتروزیس نتاج، آلل‌های متنوع از والدین بر روی هم تأثیر متقابل دارند که این تاثیر باعث بهبود صفات مورفولوژیکی می‌گردد، لذا شناسایی و نگه‌داری جمعیت‌های یونجه با فاصله ژنتیکی زیاد از هم (با توجه به نتایج تجزیه خوشه‌ای) ممکن است برای تولید نتاج برتر ضروری باشد (۹، ۳۵ و ۴۱). این تغییرات ژنی که در هیبریدها و نه در والدین تظاهر می‌یابد، باعث به وجود آمدن هتروزیس در هیبریدها می‌شود. طبعاً این جایگاه‌های ترکیب شده اگر مستقیماً به صفات مورفولوژیکی هم مرتبط نباشند

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1385.10.2.11.3]

می‌توانند روی فعالیت‌های بیولوژیکی تأثیر بگذارد. با توجه به اساسی بودن نقش بیان ژن‌ها در بروز هتروزیس که با خصوصیت مورفولوژیکی مثل رشد مجدد در بهار و پاییز، زودرسی، ارتفاع و عملکرد در یونجه ارتباط دارد (۳۵)، احتمالاً استفاده از نشانگرهای ژنتیکی که به طور تصادفی و یا از جایگاه ریز ماهواره‌ای ژنومی انتخاب شده‌اند نمی‌تواند در پیدا کردن رابطهٔ مناسبی بین فواصل ژنتیکی و هتروزیگوسیتی موفق باشد. قسمت‌های غیر کد شونده هیچ گونه اثر متقابلی در والدین به وجود نمی‌آورندکه گویای پدیده هتروزیس باشد، بنابراین قابل فهم است که چرا با استفاده از نشانگرهای AFLP و SSR رابطهٔ مشخصی بین فواصل ژنتیکی و هتروزیس پیدا نشد (۳۵). در مقابل، با توجه به لزوم بیان ژنی در اثر متقابل ژن‌های والدین در نتاج برای هتروزیس (۴۴) استفاده از EST-SSRs به دلیل این که محصول قسمت‌های کد شونده ژنومی است در تخمین فاصله ژنتیکی ژرم پلاسم‌ها منطقی‌تر خواهد بود و اطلاعات به دست آمده به دلیل انطباق بیشتر با خصوصیات بیولوژیکی ژرم پلاسم‌ها برای برنامه ریزی اصلاحی یونجه مفیدتر است.

آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش از cDNA اندام‌های مختلف ریشه، برگ و ساقه *M. truncatula* تهیه شده است وگرچه فعالیت‌های ژنی نواحی ریز ماهواره‌ای آنها کاملا شناخته شده نیست، ولی چون به نحوی در فعالیت‌های بیولوژیکی گیاه مؤثر است، می‌توان امیدوار بود که این تنوع فعالیت‌های زیستی، ژنوتیپ‌های مختلف یونجه را متمایز سازد. هرچند ریز ماهواره‌های EST-SSR که از ناحیه اگزون (Exon) به دست می‌آید، معمولاً نسبت به ریز ماهواره‌های ژنومی چندشکلی کمتری دارند (۱۳ و ۴۰)، ولی چون قابلیت تکثیر جایگاه‌های آنها در گونه‌های نزدیک به هم اثبات شده است (۴۰) می‌توان به راحتی از آنها در طبقه بندی انواع ژرم پلاسم‌های گونه‌های هم جنس استفاده نمود. در این پژوهش نیز اگر چه جایگاه‌های مختلفی از ناحیه EST-SSR گیاه *M.truncatula* در افراد جمعیت‌های یونجه مورد مطالعه تکثیر شد (۱۷ جایگاه از ۲۴ جایگاه مورد بررسی) ولی فقط تعداد محدودی از آنها (چهار جایگاه) چندشکلی بالایی را نشان داد. علی‌رغم این محدودیت تعداد، باید توجه نمود که این جایگاه‌ها از کتابخانه cDNA اندام‌های رویشی مانند برگ و ساقه (جدول ۱) که با صفات مورفولوژیکی مطابقت دارد، انتخاب شدند و در ارزیابی فواصل ژنتیکی ارقام یونجه معمولی بسیار کارآمد بودند. می‌توان از این ریزماهواره‌های EST به جای ریز ماهواره‌های ژنومی توصیه شده برای ارزیابی ارقام یونجه مانند AFct32 (۱۷ و ۲۸) استفاده کرد و امیدوار بود که رابطه‌ای بین فواصل ژنتیکی ارقام و پدیده هتروزیس پیدا نمود. انتخاب تعدادی از ارقام یونجه با فواصل ژنتیکی و مبدأ جغرافیایی مختلف برای تلاقی و بررسی احتمالی وجود رابطه هتروزیس نتاج با فواصل ژنتیکی به دست آمده از نشانگرهای EST-SSR، از جمله برنامه‌های تحقیقاتی آینده است. در صورت یافتن چنین رابطه‌ای می‌توان نشانگرهای EST-SSR معرفی شده در این پژوهش را به صورت نشانگر مناسب در تشخیص والدین و نیز هیبریدهای مناسب در برنامه اصلاحی یونجه به کار برد.

سپاسگزاری

هزینه طرح پژوهشی فوق توسط دانشگاه صنعتی اصفهان پرداخت شده است که بدین وسیله سپاسگزاری می‌شود.

منابع مورد استفاده

۱. فلاحتی عنبران، م.، ع. ا. حبشی، م. اصفهانی، س. ا. محمدی و ب. قره یاضی. ۱۳۸۲. بررسی تنوع ژنتیک جمعیت‌های زراعی یونجه ایرانی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره. مجموعه مقالات سومین همایش ملی بیوتکنولوژی، دانشگاه فردوسی مشهد.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1385.10.2.11.3]

۲. عرفانی مقدم، و. ۱۳۸۲. حفاظت شدگی و توانایی ایجاد پلی مور فیسم میکرو سا تلایت‌های در تعدادی از گونه‌های مرتعی خانواده Leguminosae ایران. پایان نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان.

۳. غمخوار، ک. ۱۳۷۶. سیستماتیک و بیو سیستماتیک جنس *Medicago* L. ایران. پایان نامه کارشناسی ارشد گیاه شناسی، دانشکده علوم. دانشگاه اصفهان.

۴. کریمی، ه. ۱۳۶۹. *یونجه*. دانشگاه تهران، مرکز نشر دانشگاهی.

5. Ahn, S. N., Y. K. Kim, H. C. Hong, S. S. Han, S. J. Kwon, H. C. Choi, H. P. Moon and S. R. McCouch. 2000. Molecular mapping of a new gene for resistance to rice blast (*Pyricularia grisea* Sacc.). Euphytica 116: 17-22.
6. Barcaccia, G., E. Albertini, S. Tavoletti, M. Falcinelli and F. Veronesi. 1999. AFLP fingerprinting in *Medicago* spp.: its development and application in linkage mapping. Plant Breed 118: 335-341.
7. Barcaccia, G., N. Tosti, E. Falistocco and F. Veronesi. 1995. Cytological, morphological and molecular analysis of controlled progenies from meiotic mutants of alfalfa producing unreduced gametes. Theor. Appl. Genet. 91: 1008-1015.
8. Bassam, B. J., G. Caetano-Anolles and P. M. Greesshoff. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 19: 680-683.
9. Bingham, E. T., R. W. Groose, D. R. Woodfield and K. K. Kidwell. 1994. Complimentary gene interactions in alfalfa are greater in autotetraploids than diploids. Crop Sci. 34: 823-829.
10. Botstein, D., R. L. White, M. Skolnick and R.W. Davis. 1980. Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am. J. Hum. Genet. 32: 314-331.
11. Brummer, E. C., G. Kochert and J. H. Bouton . 1991. RFLP variation in diploid and tetraploid alfalfa. Theor. Appl. Genet. 83: 89-96.
12. Chambers, G. K. and E. S. McAvoy. 2000. Microsatellites: consensus and controversy. Compar. Biochem. & Physiol. 126: 455-476.
13. Cho, Y. G., T. Ishii, S. Temnykh, X. Chen, L. Lipovich, S. R. McCouch, W. D. Parl, N. Ayer and S. Cartinhour. 2000. Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and GenBank sequences in rice (*Oryza sativa* L.). Theor. Appl. Genet. 100: 713-722.
14. Cordeiro, G. M., R. Casu, C. L. McIntyre, J.M Manners and R. J. Henry. 2001. Microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* spp.) ESTs cross transferable to erianthus and sorghum. Plant Sci. 160: 1115-1123.
15. Crochemore, M. L., C. Huyghe, M. C. Kerlan and B. Julier. 1996. Partitioning and distribution of RAPD variation in a set of populations of *Medicago sativa* complex. Agronomie 16: 421-432.
16. Dellaporta, S. L., J. Wood and J. B. Hicks. 1983. A plant minipreparation: Version II. Plant. Mol. Biol. Report 4: 19-21.
17. Diwan, N., A. A. Bhagwat, G. B. Bauchan and P. B. Cregan. 1997. Simple sequence repeat DNA markers in alfalfa and perennial and annual *Medicago* species. Genome 40: 887-895.
18. Echt, C. S., K. K. Kidwell, S. J. Knapp, T. C. Obsorn and T. J. McCoy. 1993. Linkage mapping in diploid alfalfa (*Medicago sativa*) Genome 37: 61-71.
19. Eujayl, I., M. E. Sorrells, M. Baum, P. Wolters and W. Powell. 2002. Isolation of Est-derived microsatellite markers for genotyping the A and B genome of wheat. Theor. Appl. Genet. 104: 399-407.
20. Falconer, D. S. 1980. Introduction to Quantitive Genetics. Ronald Press, N. Y.
21. Grist, S. A., F. A. Firgaira and A. A. Morley. 1993. Dinucleotide repeat polymorphisms isolated by polymerase chain reaction. Biotechniques 15: 304-309.
22. Jenczewski, E., J. M. Prosperi and J. Ronfort. 1999. Differentiation between natural and cultivated populations of *Medicago sativa* (Leguminosae) from Spain: analysis with random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and comparison with allozymes. Mol. Ecol. 8: 1317-1330.
23. Kijass, J. M. H., J. C. S. Fowler and M. R. Thomas. 1995. An evaluation of sequence tagged microsatellite site markers for genetic analysis within citrus ans related species. Genome 38: 349- 355.
24. Kresovich, S., A. K. Szewc-McFadden, S. M. Bliek and J. R. Mc Ferson. 1995. Abundance and characterization of simple-sequence repeats (SSRs) isolated from a size-fractioned genomic library of *Brassica napus* L. (rapeseed). Theor. Appl. Genet. 91: 206-211.
25. Lordion, K., B. cournoyer, C. Goubely, A. Depeiges and G. Picard. 1998. Length polymorphism and allel structure of trinucleotide microsatellites in natural accessions of *Arabidopsis thaliana*. Theor. Appl. Genet. 97: 591-604.
26. McKersie, B. D. 1997. Improving forage production system using biotechnology. *In*: Mc Kersie, B. D. and D. C. Brown (Eds.), Biotechnology and the improvement of forage legumes, CAB International, Oxon, UK. pp. 3-21.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1385.10.2.11.3]

27. McCoy, T. J. and C. S. Echt. 1993. Potential of trispecies bridge crosses and random amplified polymorphic DNA markers for introgression of *Medicago daghestanica* and *M. pironae* germplasm into alfalfa (*M. sativa*). Genome 36: 594-601.
28. Mengoni, A., A. Gori and M. Bazzicalupo. 2000. Use of RAPD and microsatellite (SSR) variation to assess genetic relationships among populations of tetraploid alfalfa, *Meddicago sativa*. Plant Breed. 119:311-317.
29. Nei, M. and W. H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:5269-5273.
30. Obsorn, T.C., D. Brouwer and T. J. McCoy. 1997. Molecular marker analysis of alfalfa PP: 91-109. *In*: Mc Kersie, B. D. and D. C. Brown (Eds.), Biotechnology and the Improvement of Forage Legumes, CAB International, Oxon, UK.
31. Ordas, A. 1991. Heterosis between American and Spanish populations of maize. Crop. Sci. 31: 931-933.
32. Pardian, A., F. Rebecca and P. W. J.Taylor. 2000. Transferability of sequence tagged microsatellite site (STMS) primers across four major pulses. Plant Mol. Biol Rep. 18:395-395.
33. Powell, W., M. Morgante, C. Andre, C. Hanafey, J. Vogel, S. Tingey and A. Rafalski. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Mol. Breed. 2: 225-238.
34. Pupilli, F., S. Businelli, F. Paolocci, C. Scotti, F.Damiani and S. Arcioni. 1996. Extent of RFLP variability in tetraploid populations of alfalfa, *Medicago sativa*. Plant Breed. 115: 106-112.
35. Riday, H., E. C. Brummer, T. A. Campbell, D. Luth and P. M. Cazcarro. 2003. Comparison of genetic and morphological distance with heterosis between *Medicago sativa* subsp. *sativa* and subsp. *falcate*. Euphytica 131: 37-45.
36. Roa, A. C., P. Chavarriaga-Aguirre, M. C. Duque, M. M. Maya, M. W. Bonierbale, C. Iglesias and J. Tohme. 2000. Cross species amplification of casava (*Manihot esculenta*) (*Euphorbiaceae*) microsatellites: Allelic polymorphism and degree of relationship. Am. J. Bot. 87: 1647-1655.
37. Roder, M. S., J. Plaschke, S. U. Konig, A. Borner, M. E. Sorrells, S. D. Thanksley and M. W. Ganal. 1995. Abundance, variability and chromosome location of microsatellites in wheat. Mol. Gen. Genet. 246: 327-333.
38. Rongwen, J., M. S. Akkaya, A. A. Bhagwat, U. Lavi and P. B. Cregan. 1995. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. Theor. Appl. Genet. 90: 43-48.
39. Saghai Maroof, M. A., R. M. Biyashev, G. P. Yang, Q. Zhang and R. W. Allard. 1994. Extraordinary polymorphic microsatellite DNA in barley: species diversity, chromosomal locations and population dynamics. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74: 5463-5467.
40. Scott, K. D., P. Eggler, G. Seaton, M. Rosetto, E. M. Ablett, L. S. Lee and R. J. Henry. 2000. Analysis of SSRs derived from grape ESTs. Theor. Appl. Genet. 100: 723-726.
41. Segovia-Lerma, A., R.G. Cantrell, J.M. Conway and I.M. Ray. 2003. AFLP-based assessment of genetic diversity among nine alfalfa germplasms using bulk DNA templates. Genome 46: 51-58.
42. Smulders, M. J. M., G. Bredemeijer, W. Rus-Kortekaas, P. Arens and B. Vosman. 1997. Use of short microsatellites from database sequences to generate polymorphisms among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accessions of other *Lycopersicon* species. Theor. Appl. Genet. 97: 264-272.
43. Thomas, M. R. and N. S. Scott. 1993. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analyzedas sequence-tagged sites (STSs). Theor. Appl. Genet. 86: 985-990.
44. Sun, Q., L. Wu, Z. Ni, F. Meng, Z. Wang and Z. Lin. 2004. Differential gene expression patterns in leaves between hybrids and their parental inbreds are correlated with heterosis in a wheat diallel cross. Plant Sci. 166: 651-657.
45. Vosman, B. and P. Arens. 1997. Molecular characterization of GATA/GACA microsatellite repeats in tomato. Genome 40: 25-33.
46. Yamamoto, T., T. Kimur, Y. Sawamura, K. Kotobuki, Y. Ban, T. Hayashi and N. Matsuta. 2001. SSRs isolated from apple can identify polymorphism and genetic diversity in pear. Theor. Appl. Genet. 102: 865-870.
47. Yeh, F.C., R.C. Young, B. Timothy, T. B. Boyle, Z.H. Ye and J.X. Mao. 1997. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Mol. Biol. Biotech. Cent., University of Alberta, Canada.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1385.10.2.11.3]