

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 بومی، رهنانی، نیک شهری، همدانی (از منطقه اصفهان)، همدانی (از منطقه شیراز)، یزدی و یک جمعیت رنجر آمریکایی با ۲۴ جایگاه ریز ماهواره طراحی شده از مناطق *M. sativa* 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 بومی، 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

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،

یونجه (*Medicago sativa*) به عنوان یک گیاه دائمی از خانواده لگومینوز، مهم‌ترین گیاه علوفه‌ای برای تغذیه دام است که پس

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

اهمیت آن را برای تناوب با محصولات زراعی دیگر برای حاصلخیزی خاک زیاده‌تر 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 ($2n=4x=32$) آلوگامی است که به دلیل خودناسازگاری، فقط حدود ۲۰ تا ۵۰ درصد خودگشتی دارد (۲۶). معمولاً گیاهان حاصل از خودگشتی 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 دگرگشتی (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 دگرگشتی 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 پلاسما ارقام مختلف، مخصوصاً زمانی که از منابع مختلف جمع‌آوری 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 رستگاه‌های 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 پلاسما‌های یونجه از روش‌های مولکولی مختلفی استفاده شده است. نشانگر RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) از جمله روش‌های مرسوم مولکولی 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 روش RFLP (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 همباز و سهولت کار برای تفکیک جمعیت‌های یونجه، توجه بیشتری را جلب نموده‌اند (۱، ۱۷ و ۲۸).

ریز ماهواره‌ها واحدهای نوکلئوتیدی دو، سه، چهار تا

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 دهنده چندشکلی زیادی را نشان دهند. به دلیل متغیر بودن بیش از حد جایگاه‌های ریز ماهواره که آل‌های 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 همباز (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 پلیمرز (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 ریز ماهواره، 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 کننده 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*) نیز آزمایش شد. نتایج نشان داد که ریز ماهواره‌های طراحی شده از کتابخانه ژنومی یونجه می‌تواند برای ارزیابی روابط ژنتیکی، خویشاوندی‌های تاکسونومی و تشخیص‌های ژنوتیپی گونه‌های مختلف *Medicago* استفاده شوند (۱۷). نشانگرهای ریز ماهواره‌ای در مقایسه با صفات مورفولوژیکی برای پیش‌بینی هتروزیس در

منجمد شده و تا زمان استخراج DNA در فریزر -80°C نگهداری شد.

استخراج DNA از نمونه‌های جمع آوری شده طبق روش دلاپورتا (۱۶) انجام گرفت. به این منظور پس از پودر کردن نمونه‌های برگ در حضور ازت مایع، مقدار ۶۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج (100 mM Tris-HCl pH 8.0، 50mM EDTA، 500mM NaCl، pH 8.0، 1.25% (W/V) SDS) به آن اضافه شده و بعد از مخلوط کردن به مدت ۳۰ دقیقه، در حمام آب گرم 60°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 کلروفرم-ایزوامیل 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°C نگهداری شدند و سپس دو بار استخراج با کلروفرم-ایزوامیل 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

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 پلاسما 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 ریز ماهواره (۱۷ و ۲۸) و نیز به لحاظ اثبات کارایی 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

دمای (<http://www.basic.nwu.edu/biotools/oligocalc.html>) اتصال برای آغازگرهای BEE و TC6، 54°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 نیترا ت نقره (۸) استفاده شد.

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

الگوهای بانندی 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 دو 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 $[1-\sum p_i^2]$ محاسبه شد (۱۰). در این فرمول p_i فراوانی 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،

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 میلی‌مولار، یک واحد Taq DNA polymerase (Roche Co., Germany)، ۰/۳۳ میکرومولار از هر آغازگر، ۰/۲ میلی‌مولار 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°C به مدت ۴ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشت سازی ثانویه در 94°C به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها به رشته DNA (Annealing) در 52°C به مدت ۴۵ ثانیه و بسط قطعات DNA سنتز شده (Extention) در 72°C به مدت ۹۰ ثانیه و یک چرخه بسط نهایی در 72°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

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 <i>Sinorhizobium meliloti</i>	۳۱۴
AL5	AL386409	AACCTGGAGGAATGCACCTA	ATCGCAGAACGGCTTTAAGA	(AT) ₁₃	ریشه- گیاه آلوده شده به مایکوریز <i>Glomus</i> sp.	۲۵۱
AW1	AW127339	AGAAAGCATCACGCTTGCAG	TTGGCATACAAAGGCACAAG	(TA) ₁₄	برگ- گیاه آلوده شده به قارچ <i>Colletotricum trifoli</i>	۲۵۶
AW7	AW696663	TGAGGTTTTGGGCAAGAGTT	TCCAATCATCCACACTTTG	(TTC) ₁₄	ساقه- قطعات میان گره گیاه	۲۰۴
AW8	AW697393	TTGTCGATCCATCATCATCA	CCAAGGTTCCATCTTCATCG	(CA) ₁₀	ساقه- قطعات میان گره گیاه	۱۹۷
AW9	AW776153	TGGGTGGAGGAAATTACGAC	CCACATATGTGCTGTTTCCA	(CAA) ₁₁	برگ- گیاه آلوده شده به قارچ <i>Colletotricum trifoli</i>	۱۵۷
BE1	BE319577	GGCCAGCTGTGTAAGACATTT	CCCCAACCAACCACACAAAA	(TA) ₂₇	ریشه- گیاه در حال نمو	۲۶۷
BE2	BE322149	TTGCATTGCTTCCCTTATTACA	CCCTTCTTCCTTTGTGTTCACT	(TC) ₁₆	برگ- گیاه تغذیه شده با آفت <i>Spodoptera exiqua</i>	۲۶۰
BE5	BE322956	TCTCTAAAACTACCCGCCACTT	CCTCAGAATCAACAACGCTCT	(CT) ₁₀	برگ- گیاه تغذیه شده با آفت <i>Spodoptera exiqua</i>	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	AAGAGGTTAAGTGCAAAAAACACA	GACCACACATCTTCTTCCATGA	(TTA) ₁₁	برگ- گیاه تحت تنش فسفات	۲۴۱
BE15	BE325413	CATCGCTGTCGTTTTTGTTTTT	ACTGCTTCTTTGATCCTGCAA	(CT) ₁₀	ساقه- قطعات میان گره گیاه	۲۰۷
BE16	BE325495	CAGCCACATTTTGCTGTAAAGA	AGTAACCTTTGACCCACGCAT	(TC) ₁₀	ساقه- قطعات میان گره گیاه	۲۲۸
BEA	BE315997	GAAAGAAAGATGGCGGTTTCA	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	GGGTCACTTGTGTTTGTCTCC	(CT) ₁₀	برگ- مخلوط برگهای جوان، بالغ و مسن گیاه	۲۶۱
BEE	BE317653	CACGAGGCACACTTCCATT	GTTGTTTGTGTCCTCCAGGAG	(TC) ₁₇	برگ- مخلوط برگهای جوان، بالغ و مسن گیاه	۲۵۰
BEF	BE318535	TCCTTCGTCCTTTTCATTTTCTCA	TTCCAACCCCTCTTGGACAAA	(GGA) ₅	برگ- مخلوط برگهای جوان، بالغ و مسن گیاه	۲۴۴
TC1	TC10130	GGGTCAAAGAAAAAGCCAAC	GCAGACACAACCTCATGATACG	(TTC) ₁₀	ساقه- گیاه در حال نمو	۲۱۲
TC2	TC11276	CCTTCGCTTTTTCATTTTCTCA	TTCCAACCCCTCTTGGACAAA	(CT) ₁₀	ریشه- گیاه آلوده شده به <i>Sinorhizobium meliloti</i>	۲۴۳
TC5	TC12008	ATGGTGGTAGCGGTAGCAGT	CACCCCTTCGAAACATCCATTT	(ATT) ₁₆	ریشه- گیاه آلوده شده به <i>Sinorhizobium meliloti</i>	۲۳۰
TC6	TC12878	CACCTCACACTCAACACACAACA	ACGCCCTCTCTTCCGATCTT	(AG) ₁₂	ساقه- گیاه در حال نمو	۲۰۰
TC7	TC12985	CCAACATCCTTTTCTCTTCC	TTCTCTCCATACCTCGCTCAA	(GAA) ₁₃	برگ- گیاه تغذیه شده با آفت <i>Spodoptera exiqua</i>	۲۰۹
AFct32	Diwan <i>et al.</i> , 1997	TTTTTGTCACCTCATTAG	TTGGTTAGATTCAAAGGGTTAC	(CT) ₁₄	از کتابخانه ژنومی	۱۰۶-۱۲۷
Afca11	Diwan <i>et al.</i> , 1997	CTTGAGGGAACTATGTTGAGT	AACGTTTCCCAAAACATACCTT	(CA) ₁₁	از کتابخانه ژنومی	۱۳۸-۱۶۴
Afctt1	Diwan <i>et al.</i> , 1997	CCCATCATCAACATTTTCA	TTGTGGATTGGAAACGAGT	(CTT) ₆ / (CAA) ₃	از کتابخانه ژنومی	۹۷-۱۲۲

تعداد آل‌های موجود برای هر فرد در هر جایگاه از ۱ تا ۶ فرق می‌کرد ولی ۹۷٪ افراد ۳ تا ۴ آل متفاوت داشتند که به خاطر هتروزیگوسیتی و سطح پلوئیدی، ارقام یونجه معمولی بود. دو آل ۱۱۱ و ۱۰۷ در بین افراد جمعیت‌های یونجه مشترک بود ولی بعضی آل‌ها (۱۱۹، ۱۰۹، ۱۰۸ و ۹۳) در داخل یک 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 نوکلئوتیدی و دو نوکلئوتیدی داشتند و تکرارهای هر کدام از آنها (طول ریز ماهواره) نیز متفاوت بود، ولی رابطه مشخصی بین ایجاد پلی مورفیسم و تنوع آلی با تعداد نوکلئوتیدهای نگاره (دوتایی یا سه تایی) و نیز طول ریز ماهواره به دست نیامد.

در ارزیابی افراد داخل جمعیت یونجه‌های بومی، تنوع ژنتیکی قابل توجهی به دست آمد. حداکثر این اختلاف ژنتیکی در جمعیت یونجه همدانی جمع آوری شده از شیراز (۸۴٪) و حداقل آن نیز در جمعیت رنجر آمریکایی (۶۳٪) مشاهده شد. میزان تنوع ژنتیکی در جمعیت رهنانی ۷۱٪، بمی ۷۱٪، یزدی ۷۳٪، نیک شهری ۷۷٪ و همدانی جمع آوری شده از اصفهان ۸۰٪ برآورد شد که وجود این تنوع ژنتیکی زیاد در داخل جمعیت‌های مورد بررسی به دلیل طبیعت دگرگشن و تراپلوئید بودن یونجه قابل تصور است.

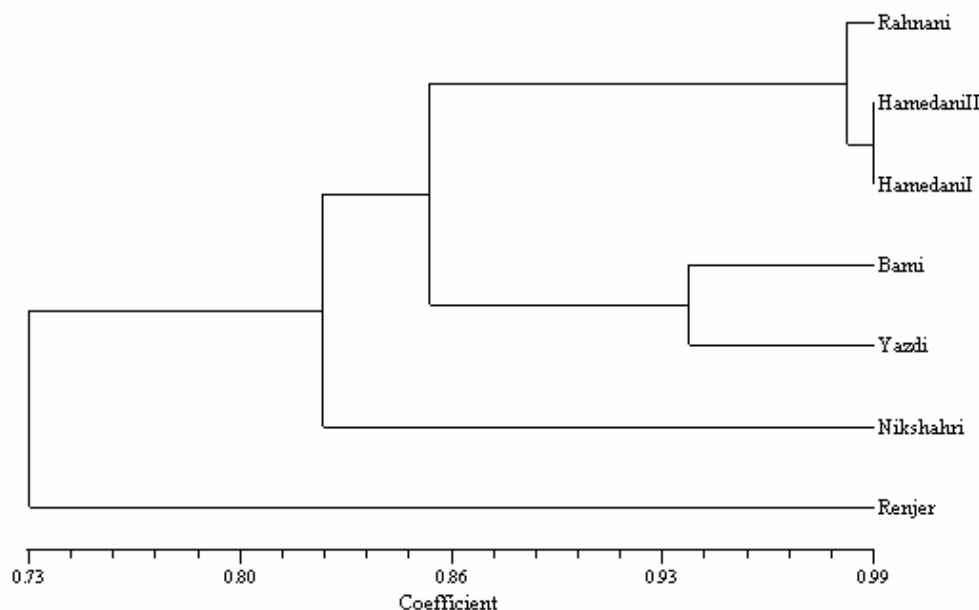
بر اساس دندروگرام به دست آمده از روش UPGMA (شکل ۲)، جمعیت رنجر آمریکایی در یک گروه کاملاً مجزا قرار گرفت. دلیل این امر سینتیک بودن رقم رنجر است، در صورتی که بقیه ارقام مورد بررسی توده‌های بومی هستند. با توجه به این دندروگرام، ارقام رهنانی و همدانی در یک گروه قرار گرفتند و جمعیت یونجه‌های یزدی و بمی با جمعیت نیک شهری به یک گروه دیگر تعلق پیدا کرد. متفاوت بودن فاصله ژنتیکی یونجه‌های یزدی، بمی و مخصوصاً نیک شهری (که در صورت منطقی بودن نامگذاری آنها باید جزو ارقام سازگار به مناطق گرمسیری محسوب شود)، از بقیه ارقام؛ به نحوی چنین القا می‌کند که احتمالاً تغییرات ژنتیکی ارقام یونجه با تنوع مبدأ

BEC، AW7، TC1 و TC5 قادر به تکثیر جایگاه مورد نظر نبودند که احتمالاً به خاطر متفاوت بودن توالی‌های احاطه کننده جایگاه‌ها (Flanking region) در یک یا دو جایگاه اتصال آغازگر بوده است. در بین این آغازگرها نه (۹) آغازگر (AL5، AW8، BE5، BE6، BE9، BE11، BE15، BEF و TC2) و دو آغازگر طراحی شده از کتابخانه ژنومی 1 AFct و 1 AFcal، باندهای یک شکل تولید نمودند. تنوع آلی آغازگرهای-EST SSR شامل BE16 (دو آل)، AW1 (سه آل) و AL2 (چهار آل) چندشکلی نشان نداد که برای ارزیابی فواصل ژنتیکی بین ژرم پلاسما سودمند باشد. در مقابل، آغازگرهای BEE با شش آل، TC7 با نه آل، AW9 با ۱۱ آل و TC6 با ۱۱ آل، چندشکلی بسیار بالایی را نشان داد. تکثیر جایگاه‌های ریزماهواره یونجه زراعی با نشانگرهای *M. truncatula* که اندازه آل‌ها تقریباً در دامنه مورد انتظار برای هر جایگاه بود، امکان استفاده از این ریزماهواره‌های EST برای تعیین تنوع ژنتیکی میان جمعیت‌های یونجه جمع آوری شده را فراهم ساخت. اندازه مورد انتظار و فاصله کم آل‌ها از همدیگر و کیفیت خوب باندها روی ژل، بیانگر سطح بالای حفاظت شدگی (Conservation) توالی‌های احاطه کننده جایگاه‌های ریزماهواره *M. truncatula* در یونجه زراعی بود که کارآمد بودن این EST-SSRs را برای تولید چندشکلی در ژنوتیپ‌های 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 آل برای ارزیابی تنوع ژنتیکی میان جمعیت‌های یونجه مورد استفاده قرار گرفت که در مجموع ۴۶ آل ردیابی شد. بیشترین ضریب تنوع (Diversity index) برای جمعیت‌های یونجه در جایگاه‌های AW9 (۰/۸۶)، TC7 (۰/۸۷) و کمترین آن در جایگاه BEE (۰/۶۲) مشاهده شد. بیشترین تنوع آلی نیز مربوط به جایگاه‌های TC6 و AW9 (۱۱ آل) بود، در حالی که جایگاه BEE با شش آل کمترین تنوع را داشت (جدول ۲).

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

اندازه آلی (bp)	آغازگر	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 آل در هر جمعیت	۹	۶	۱۱	۱۱	۹	۴۶	
شاخص تنوع ($1-\sum p_i^2$)	۰/۷۷	۰/۶۲	۰/۸۶	۰/۸۱	۰/۸۷	$\overline{X}=0/786$	



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 آلی 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)

گلایی (۴۶) و محصولات دیگر گزارش شده است. گرچه 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. truncatula* در تولید موفق تعداد زیادی آلل در یونجه زراعی مشخص نمود که این نشانگرها می‌توانند در تعیین مشخصات ژرم پلاسماهای یونجه و حتی تهیه نقشه ژنتیکی آنها استفاده شوند. بعضی از محققین میزان چندشکلی ریز ماهواره‌ها 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 (BE15, BE5, AL5) و یا سه تایی (BEF, BEA, AW8) 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

مختلف پیدا نشد. بعضی از پژوهشگران با در نظر گرفتن پدیده Slipped-strand mispairing (۲۵) در طی نسخه برداری DNA عنوان می کنند که با طولی تر بودن طول ریز ماهواره، میزان چندشکلی افزایش می یابد (۲۱، ۴۲ و ۴۳). در واقع به دلیل احتمال زیاد وقوع موتاسیون در ریز ماهواره های بلند و نواحی مجاور آنها نسبت به ریز ماهواره های کوتاه، ریز ماهواره های با تعداد تکرار نگاره زیاد در تمایز ژنوتیپ ها 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 جمعیت های مورد مطالعه، سطح هتروزیگوسیتی جمعیت های یونجه بومی ایران نسبت به جمعیت رنجر آمریکایی بالاتر بود که نشان می دهد یونجه های ایرانی به دلیل این که در برنامه های اصلاح نباتات قرار نگرفته اند، زمینه ژنتیکی متنوع تری دارند و می توان از آنها برای انتخاب ژنوتیپ های متنوع به منظور تولید ارقام جدید استفاده کرد. چندشکلی آلی کمتر در جمعیت رنجر آمریکایی و نیز فاصله ژنتیکی مشخص آن از ارقام ایرانی (شکل ۲) گرچه بر سینتیک بودن این رقم یونجه تأکید می کند، ولی به هر حال به نظر می رسد 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 ژنوتیپ های 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 می رسد ریز ماهواره های مورد استفاده به خوبی توانسته باشند تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه ای بین ارقام معتدل تر مانند همدانی و رهنانی با ارقام گرمسیری بمی، یزدی و نیک شهری مشخص نمایند. در صورتی که به توان با ارزیابی ژنوتیپ های بیشتر و متنوع تر از نظر اقلیمی این آزمایش ها را تکرار نمود، احتمالاً رابطه مناسبی بین تغییرات ژنتیکی ارقام با مبدأ جغرافیایی آنها پیدا خواهد شد که در شناسایی ارقام با زمینه های ژنتیکی متنوع

و دارای فاصله دورتر ژنتیکی اهمیت دارد. چنین یافته هایی 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 پلاسماها فراهم خواهد ساخت.

نزدیکی فواصل ژنتیکی ارقام همدانی و رهنانی نیز قابل توجه بود و مجدداً تأیید نمود که ژنوتیپ های متعلق به مناطق معتدل تر با ارقام گرمسیری مانند نیک شهری، زمینه های ژنتیکی مختلفی دارند که از آنها می توان برای ایجاد ارقام هیبرید جدید با هتروزیس بالا استفاده کرد. این مطلب با توجه به یافته های قبلی که تأکید می نماید، میزان هتروزیس بین جوامع از میزان هتروزیس داخل جوامع بیشتر است (۳۱) و هر چقدر والدین از نظر ژنتیکی و منطقه جغرافیایی دورتر باشند؛ دورگ های حاصل از تلاقی آنها دارای هتروزیس بیشتری خواهند بود (۲۰)؛ اهمیت دارد. بنابراین توجه به انتخاب والدین از میان جمعیت های نیک شهری و نیز همدانی یا رهنانی در برنامه اصلاح یونجه بومی را بیشتر یادآوری می کند. 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 شده اند و می توانند فعالیت های بیولوژیکی و در ادامه تغییرات فنوتیپی را متمایز سازند (۱۹) به طوری که این اطلاعات به دست آمده، شباهت ها و تفاوت های ژنوم جمعیت ها را از نظر عملکرد ژن های آنها ارائه می دهد. ظاهراً در پدیده هتروزیس نتاج، آلل های متنوع از والدین بر روی هم تأثیر متقابل دارند که این تأثیر باعث بهبود صفات مورفولوژیکی می گردد، لذا شناسایی و نگهداری جمعیت های یونجه با فاصله ژنتیکی زیاد از هم (با توجه به نتایج تجزیه خوشه ای) ممکن است برای تولید نتاج برتر ضروری باشد (۹، ۳۵ و ۴۱). این تغییرات ژنی که در هیبریدها و نه در والدین تظاهر می یابد، باعث به وجود آمدن هتروزیس در هیبریدها می شود. طبعاً این جایگاه های ترکیب شده اگر مستقیماً به صفات مورفولوژیکی هم مرتبط نباشند

(۴۰) می‌توان به راحتی از آنها در طبقه بندی انواع ژرم پلاسماهای 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 ریزماهوره‌های EST به جای ریز ماهره‌های 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.

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 ماهره‌ای ژنومی انتخاب شده‌اند نمی‌تواند در پیدا کردن رابطه مناسبی بین فواصل ژنتیکی و هتروزیگوسیتی موفق باشد. قسمت‌های غیر کد شونده هیچ گونه اثر متقابلی در والدین به وجود نمی‌آورند که گویای پدیده هتروزیس باشد، بنابراین قابل فهم است که چرا با استفاده از نشانگرهای AFLP و SSR رابطه 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 پلاسماها منطقی‌تر خواهد بود و اطلاعات به دست آمده به دلیل انطباق بیشتر با خصوصیات بیولوژیکی ژرم پلاسماها 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 و گرچه فعالیت‌های ژنی نواحی ریز ماهره‌ای آنها کاملاً 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 ماهره‌های EST-SSR که از ناحیه اگزون (Exon) به دست می‌آید، معمولاً نسبت به ریز ماهره‌های ژنومی چندشکلی کمتری دارند (۱۳ و ۴۰)، ولی چون قابلیت تکثیر جایگاه‌های آنها در گونه‌های نزدیک به هم اثبات شده است

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 ریزماهوره. مجموعه مقالات سومین همایش ملی بیوتکنولوژی، دانشگاه فردوسی مشهد.

۲. عرفانی مقدم، و. ۱۳۸۲. حفاظت شدگی و توانایی ایجاد پلی مور فیسیم میکرو سا تلایتهای در تعدادی از گونه‌های مرتعی خانواده Leguminosae ایران. پایان نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان.
۳. غمخور، ک. ۱۳۷۶. سیستماتیک و بيو 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 miniprep: 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. Bliet 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 allele 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.

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, *Medicago 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. Paolucci, 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. Cazarro. 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 analyzed as 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.