

بررسی تنوع ژنتیکی ارقام و توده های یونجه های (*Medicago sativa* L.)

تحت کشت در ایران با استفاده از نشانگرهای RAPD

علی اکبر شاه نجات بوشهری*^۱، حیدر علی فتاحی^۱، بهمن یزدی صمدی^۳
۱- دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات دانشگاه کشاورزی دانشگاه تهران
۲ و ۳- به ترتیب دانشیار و استاد دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران
*نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: ashah@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۸۷/۶/۶ - تاریخ پذیرش: ۸۸/۲/۵)

چکیده

در این تحقیق بررسی تنوع ژنتیکی ۲۸ رقم ایرانی و خارجی یونجه زراعی (*Medicago sativa* L.) با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD بررسی گردید. برای این منظور بانک DNA ژنومی از برگ گیاهان استخراج و توسط ۱۴ پرایمر تصادفی RAPD تکثیر و مورد ارزیابی قرار گرفت. در مجموع ۲۰۰ باند شناسائی گردید که ۵۹ درصد آن چند شکلی داشت. بر مبنای آنالیز روابط ژنتیکی ارقام به روش تجزیه خوشه‌ای و براساس ماتریس ضرایب تشابه تطابق ساده، داده‌های مولکولی همپوشانی مطلوبی با مناطق جغرافیائی نشان نداد. میزان تشابه ژنتیکی از ۰/۸۱ (جمعیت های زنجان و میاندوآب) تا ۰/۴۳ (جمعیت های جلفا و بمی) متغیر بود. میانگین تشابه ژنتیکی ۰/۶۱ بدست آمد. بر اساس نتایج بدست آمده مشخص شد که ارقام از دامنه تنوع ژنتیکی پائینی برخوردار بوده و گسترش پایه ژنتیکی ارقام نیازی جدی به شمار می‌رود. این امر را می‌توان به پدیده انتقال فیزیکی بین جمعیت‌ها و دگرگش بودن جمعیت‌های یونجه زراعی نسبت داد که خود متأثر از فعالیت حشرات بوده که با انتقال دانه گرده در بین ارقام سبب اختلاط و همپوشانی ارقام و افزایش تشابه ژنتیکی می‌گردد.

واژه های کلیدی

یونجه ،
تشابه ژنتیکی ،
چندشکلی ،
RAPD ،

مقدمه

جنس *Medicago* دارای ۵۶ گونه می‌باشد که ۲۲ گونه آن چندساله آلوگام و ۳۴ گونه یک ساله اتوگام است. تعداد کروموزم‌های پایه گونه‌های مختلف یونجه $X=8$ و در برخی گونه‌ها $X=7$ می‌باشد. از جمله این آلوگام‌های چندساله می‌توان به *Medicago sativa* ($2n=4x=32$) اشاره کرد که یکی از گیاهان مهم گیاه علوفه‌ای دنیا می‌باشد. گونه‌های یونجه عموماً آلوگام بوده و بین ۷۲ تا ۸۷ درصد دگرگش می‌باشند.

نیز مورد ارزیابی قرار گرفته است (فاجولوس و همکاران ۲۰۰۵، موسیال و همکاران ۲۰۰۲، سگویا لوما و همکاران ۲۰۰۳، فرشادفر و فرشادفر ۲۰۰۸). خاستگاه یونجه ایران است. با توجه به کمبود علوفه و نیاز به تهیه ارقام اصلاح شده در داخل کشور، هدف این تحقیق بر پایه بررسی تنوع ژنتیکی ارقام با استفاده از نشانگرهای **RAPD** قرار گرفت.

مواد و روش ها

مواد گیاهی: در این بررسی به منظور استخراج DNA جهت مطالعه تنوع ژنتیکی بین ارقام از ۲۸ رقم ایرانی و خارجی تحت کشت در ایران استفاده گردید. ارقام مورد بررسی عبارت بودند از: کرمان، ملکان تبریز، رهنان اصفهان، قره یونجه، خوانساری، فریدون شهر، شهرکردی، کریستاری (خارجی)، شهر بابک، کدی (خارجی)، رهنان، رنجر، یزدی، بمی، اصفهان، جلفا، استرالیایی (خارجی)، رهنانی، نیک شهری، افغانی، زنجان، سیمرچنسکایا (خارجی)، پاکستانی (خارجی)، تربتی، دامغان، همدانی، میانداوب، ایرانشهر.

استخراج DNA: استخراج DNA بر مبنای روش سقای معروف (۱۹۸۴) با اندکی تغییر صورت گرفت. میزان ۰/۱ تا ۰/۱۵ گرم از ۱۰ برگ جوان توسط ازت مایع در یک هاون چینی کوبیده شد. سپس به همراه ۸۰۰ میکرو لیتر بافر استخراج کننده (تریس ۱۰۰ میلی مول با $pH=8$ ، ۱۰ گرم CTAB، ۱۰ میلی لیتر Tris-HCl ۱ مولار با $pH=8$ ، ۲۰ میلی لیتر EDTA ۰/۰۵ مولار با $pH=8$ ، ۱۴۰ میلی لیتر NaCl ۵ مولار، ۲۹۰ میلی لیتر H_2O) به یک تیوب ۱/۵ میلی لیتری منتقل گردید و در بن ماری ۴۵-۳۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه نگهداری شدند (در بن ماری هر ۱۰ دقیقه یکبار تیوب ها به آرامی مخلوط شدند). در مرحله بعد به مقدار دو سوم مخلوط داخل تیوب از محلول کلورفرم- ایزوآمیل الکل (۱:۲۴) به هر تیوب اضافه و به آرامی به مدت ۱۰ دقیقه تا ظهور رنگ سبز تیره این مخلوط به هم زده شد. سپس تیوب ها با دور ۱۳۰۰۰ و به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای اتاق سانتریفیوژ شدند، مایع رویی هر تیوب به تیوب جدید منتقل و ۸۰۰ میکرو لیتر ایزوپروپانول سرد به هر یک اضافه شد. تیوب ها چند بار به آرامی مخلوط و در دمای

این میزان بستگی به شرایط محیطی و ژنوتیپ گیاه و میزان فعالیت حشرات دارد. (کاناپ و توبر ۱۹۹۳، براون و بینگام ۱۹۹۴). بنابر نظر واویلف^۱ دانشمند روسی، مبدأ یونجه مرکز خاور نزدیک، آسیای صغیر، قفقاز، ایران و مناطق کوهستانی ترکمنستان روسیه است (کریمی، ۱۳۶۹).

ابداع نشانگرهای ژنتیکی مولکولی، امکان بررسی های گسترده ای را فراهم آورده است. مزیت نشانگرهای مولکولی بر نشانگرهای کلاسیک در توان بهره گیری از پلی مورفیسم های طبیعی موجود در جوامع است. در اکثر جوامع طبیعی، چندشکلی های به نسبت بالایی وجود دارد که در اثر تغییرات کوچکی در توالی های DNA نظیر جهش های نقطه ای، جایگزینی های بازی، حذف و تبادل حادث شده اند و فنوتیپ مشخصی هم ندارند. فناوری های جدید با آشکارسازی این چندشکلی ها کارآمدی بالای خود را در شناخت تفاوت های فردی به اثبات رسانده است. فراوانی نشانگرهای مولکولی فوق العاده زیاد است و در سراسر ژنوم یافت می شوند. به علاوه عوامل نموی، اختصاصیت بافتی و محیطی در تشخیص این چندشکلی بی تاثیر است (شاه نجات بوشهری، ۱۳۸۵). به کارگیری نشانگرهای مولکولی در یونجه کاربرد گسترده ای داشته است، در این راستا از مارکرهای مولکولی برای شناسایی و مقایسه آرایش ژنتیکی ارقام و جمعیت های یونجه (برومر و همکاران ۱۹۹۱، کیدول و همکاران ۱۹۹۴)، شناسایی ویژگی های منحصر به فرد ژرم پلاسما یونجه (پویلی و همکاران ۱۹۹۵)، نقشه یابی مولکولی مکان های کنترل کننده صفات مهم بر روی ژنوم یونجه (کیس و همکاران ۱۹۹۳، یو و پائولس ۱۹۹۳، اسلج و همکاران ۲۰۰۵)، شناسایی ژن های انتقال یافته به نتاج در تلاقی بین گونه های یونجه (مک کوی و اسمیت ۱۹۸۶، مک کوی و اشت ۱۹۹۳)، بررسی تفرق ژنتیکی (اشت و همکاران ۱۹۹۱) به کار رفته است. برومر و همکاران (۱۹۹۵) به آنالیز یونجه های یکساله با نشانگر RAPD پرداختند. قراردی و همکاران (۱۹۹۸) فاصله جوامع یونجه را با RAPD تخمین زدند. منگونی و همکاران (۱۹۹۹) به وسیله RAPD و SSR روابط جوامع تراپلوئید یونجه را ارزیابی کردند. تنوع ژنتیکی با مارکرهای دیگر

چرخه و شامل: ۱ دقیقه در دمای ۹۲ درجه، ۱ دقیقه در دمای ۳۷ درجه، ۲ دقیقه در دمای ۷۲ درجه. ۳- سیکل سوم ۳۵ چرخه و شامل: ۱ دقیقه در دمای ۹۲ درجه، ۱ دقیقه در دمای ۳۵ درجه، ۲ دقیقه در دمای ۷۲ درجه. ۴- سیکل چهارم شامل یک مرحله ۵ دقیقه ای در دمای ۷۲ درجه برای تکمیل بسط DNA انجام گرفت. در واقع برای جلوگیری از تکثیر های تصادفی از برنامه Touchdown استفاده شد. در این روش، واکنش ابتدا با دمای اتصال بالاتر از T_m آغازگر شروع می شود و سپس در طی چرخه های ابتدایی PCR دمای اتصال به تدریج تا پایین تر از T_m کاهش داده می شود. این روش باعث می شود که اتصال اختصاصی آغازگرها به توالی هدف قبل از هرگونه اتصال غیراختصاصی انجام گیرد. که ۵ چرخه اول از ۳۷ درجه سانتیگراد شروع و هر سیکل ۰/۵ درجه از دمای اتصال کاسته و در دمای ۳۵ درجه بعد از ۵ سیکل دما ثابت و ۳۵ سیکل بعدی شروع شد. پس از اتمام چرخه ها، نمونه ها از دستگاه خارج شده و تا قبل از الکتروفورز در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد قرار گرفتند.

الکتروفورز فرآورده های تکثیر شده: نمونه های حاصل از PCR بر روی ژل عمودی اکرلامید توسط دستگاه Bio-Rad الکتروفورز و غلظت نهایی ژل اکرلامید ۳/۵ درصد انتخاب گردید. ولتاژ الکتروفورز ۱۶۰ ولت در نظر گرفته شد. پس از پایان الکتروفورز ژل با نیترات نقره رنگ آمیزی و سپس از آن عکس برداری گردید.

تجزیه و تحلیل و امتیاز بندی باندهای حاصل از داده های مولکولی: امتیاز بندی باندها بصورت صفر (عدم وجود باند) و یک (وجود باند) صورت گرفت. پس از این مرحله ماتریس تشابه و تجزیه خوشه ای با استفاده از نرم افزار NTSYS (رولف، ۱۹۹۰) بدست آمد و دندروگرام بر اساس الگوی کامل^۱ (رولف، ۱۹۹۰) و ضریب تشابه تطابق ساده (سوکال و میچنر ۱۹۵۸) رسم شد. برای تعیین رابطه بین دو دسته از داده ها از آزمون مانتل استفاده شد (۱۹۶۷). برای تعیین اینکه رابطه ای بین یک دسته از

۲۰- درجه به مدت ۲۰ دقیقه نگهداری شدند. در مرحله بعدی تیوب ها با دور ۱۳۰۰۰ و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس مایع رویی دور ریخته شد و تیوب حاوی رسوب DNA خشک شد. در این مرحله پس از افزودن ۱۰۰ میکرو لیتر TE به تیوب ها، ۸۰۰ میکرو لیتر مخلوط استات آمونیم ۲/۵ مولار الکل: ۱۰۰٪ (به نسبت ۱/۵ cc : ۳/۵ cc) به هر تیوب اضافه گردید تیوب ها به آرامی هم زده شدند و دوباره در دمای ۲۰- درجه به مدت ۲۰ دقیقه نگهداری شدند. در این مرحله تیوب ها با دور ۱۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتریفیوژ شدند. مایع رویی تیوب ها، دور ریخته شد و ۶۰۰ میکرو لیتر الکل ۷۰٪ به هر تیوب اضافه شد و سپس چند بار به آرامی هم زده شدند. تیوب ها با دور ۱۳۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند مایع رویی دور ریخته شد و سپس تیوب ها کاملاً خشک شدند و در مرحله آخر به هر تیوب ۲۰۰ میکرو لیتر TE اضافه شد. کمیت و کیفیت DNA توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Shimadzu UV- VIS Recording Spectrophotometer تعیین گردید. برای اسیدهای نوکلئیکی که از منابع بیولوژیکی استخراج می شوند، محاسبه نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر برآوردی از میزان پروتئین را در اختیار قرار می دهد. در صورتی که DNA عاری از پروتئین باشد این نسبت، ۱/۸ خواهد شد. در صورت آلودگی نمونه با پروتئین یا فنل، نسبت مذکور به پائین تر از ۱/۸ کاهش پیدا می کند. وجود RNA در نمونه، نسبت مذکور را به بیش از ۱/۸ سوق می دهد. RNA خالص این نسبت را به ۲ نزدیک می کند (سیدمن، ۲۰۰۸)

واکنش RAPD-PCR براساس روش ویلیامز و همکاران (۱۹۹۰) انجام گرفت. حجم نهایی واکنش PCR برای هر نمونه ۲۵ میکرو لیتر بود آغازگرها از شرکت UBC (University of British Colombia) خریداری شده بودند. در این آزمایش از دستگاه ترموسایکلر (Perkin elmer DNA Thermal cycler 480) استفاده شد. چرخه های دمایی واکنش PCR به صورت زیر بودند:

۱- سیکل اول ۲ دقیقه و در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد برای شروع واکنش سازی DNA انجام گرفت. ۲- سیکل دوم ۵

¹ Complete

RAPD بین ۰/۲۸۳ تا ۰/۴۱۲ و با میانگین ۰/۲۹۶ بدست آوردند. سمیعی و همکاران (۱۳۸۳) در مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت‌های شبدر میزان ضریب تشابه با استفاده از تطابق ساده بین ۰/۳۶ تا ۰/۹۰ و با میانگین ۰/۶۷ بدست آوردند. در این بررسی از ضریب تطابق ساده برای رسم نمودار خوشه‌ای با ضریب کوفتیک $r=0/673$ استفاده شد که توسط آزمون مانتل و در سطح یک درصد معنی‌دار بودند. سمیعی و همکاران (۱۳۸۴) با استفاده از ضریب جاکارد همبستگی کوفتیک را ۰/۸۲ بدست آوردند.

در دندورگرام به دست آمده (شکل ۳)، چهار کلاستر شناسایی گردید، که در دسته اول ارقام کرمان، رهنان اصفهان، خوانساری، شهرکردی و یزدی ارقام شهر بابک دامغان، پاکستان، نیک‌شهری، زنجان و میاندوآب قرار گرفتند. در این کلاستر از ۱۱ رقم موجود در آن، ۵ رقم کرمان، یزدی، نیک‌شهری، شهر بابک و پاکستانی جایگاه مناسبی را در دندورگرام به خود گرفته‌اند، به طوری که متعلق به مناطق گرمسیر و سردسیر با متوسط ضریب تشابه ۰/۶۸۵ هستند. دسته دوم شامل ارقام رهنان، ملکان تبریز، قره‌یونجه، کریستاری و فریدون شهری، اصفهان، کدی، رنجر و بمی بودند. به جز رقم بمی گرمسیر بقیه ارقام سردسیر و جایگاه مطلوبی را در دندورگرام به خود اختصاص دادند. متوسط میزان تشابه ژنتیکی در این دسته ۰/۶۴۸ بود. دسته سوم عمدتاً شامل ارقام نیمه سرد تا نیمه گرم بودند، که ارقام استرالیایی، افغانی، رهنانی، سیمر، تربتی و ایران‌شهری از آن جمله‌اند (متوسط میزان تشابه ژنتیکی ۰/۶۰۴). ارقام در این دسته از نظر خصوصیت اقلیمی وضع مشخصی ندارند. در دسته چهارم، دو رقم جلفا و همدانی با میزان تشابه ۰/۶۰۱ قرار دارند، این دو رقم از ارقام منطقه شمال غربی کشور بوده و از خصوصیات بارز آنها می‌توان به مقاومت بسیار بالا به سرمای زمستان اشاره نمود. در خصوص عدم تطابق ارقام با شرایط اقلیمی در کلاسترها، این نکته قابل ذکر است که این عدم تطابق امری مرسوم در یونجه‌های مختلف کشور می‌باشد. به طور مثال در آزمایش‌هایی که در کرج (یزدی صمدی ۱۳۷۱) و مشهد (کوچکی و همکاران ۱۳۵۷) انجام گرفت به ترتیب ارقام کرمان و بمی (هر دو گرمسیر) بالاترین عملکرد را نشان دادند.

داده‌ها با دسته دیگر وجود دارد یا خیر می‌توان از این آزمون استفاده کرد. برای تعیین همبستگی بین ماتریس کوفتیک (ماتریسی که براساس دندورگرام به دست می‌آید) و ماتریس فاصله یا تشابه (براساس آن خوشه‌بندی صورت می‌گیرد)، همبستگی کوفتیک محاسبه شد. این ضریب می‌تواند به عنوان معیاری برای اندازه‌گیری نیکویی برازش خوشه‌بندی مورد استفاده قرار گیرد.

نتایج و بحث

در این تحقیق با آزمایش ۱۴ پرایمر انتخابی (جدول ۱) در مجموع ۲۰۰ باند تکثیر شده قابل نمره‌دهی بودند. (شکل ۱). باندهایی که از وضوح خوبی برخوردار نبودند، حذف شدند. اندازه باندها از ۴۷۰۰ تا ۵۵۰ جفت باز متغیر بودند. تعداد کل باندهای تکثیر شده به ازای هر پرایمر از ۱۷ باند (UBC ۶۴) تا ۴ باند (UBC ۸۲) متغیر بودند (شکل ۲، الف). میانگین کل باندها ۱۴/۲ و تعداد باندهای پلی مورفیک ۱۱۸ بود، یعنی به طور متوسط هر آغازگر ۸/۴۲ باند چند شکل تولید کرد (شکل ۲). برومر و همکاران (۱۹۹۹) متوسط تعداد باند را در گونه‌های مختلف یونجه ۳/۲ را گزارش نمودند. فلاحتی و همکاران (۱۳۸۴)، متوسط تعداد باند را در ارقام مختلف یونجه ۲/۲۶ باند در هر گیاه بدست آوردند.

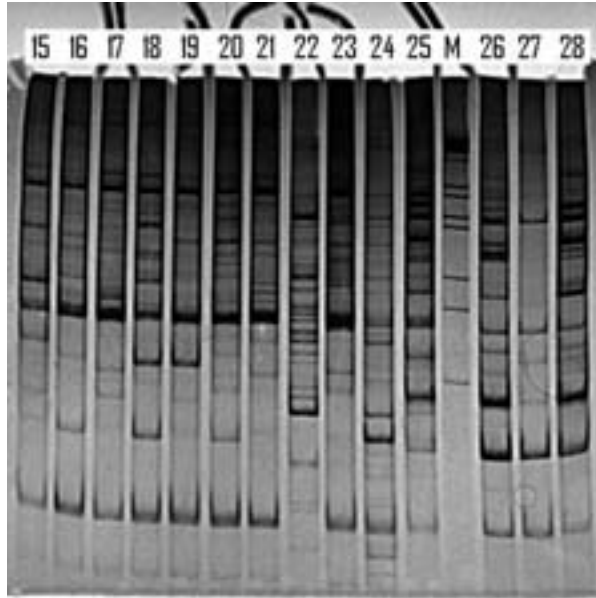
نسبت باند های چند شکل ۵۹ درصد و باندهای چند شکل بیشتر در محدوده ۳۸۰۰ جفت باز تا ۱۲۰۰ جفت باز قرار داشتند. میزان درصد چندشکلی در بین آغازگرها از ۳۷ درصد برای UBC۶۱ تا ۸۵ درصد در UBC۶۴ متغیر بود (شکل ۲، ب). میزان تشابه ژنتیکی با استفاده از ضرایب تطابق ساده انجام گرفت که در توده‌های زنجان و میاندوآب با ۰/۸۱ میزان تشابه دارای بیشترین و جمعیت‌های جلفا و بمی با ۰/۴۳ دارای کمترین میزان تشابه ژنتیکی بودند. میانگین تشابه ژنتیکی ۰/۶۱ بود. نظر به اینکه خاستگاه اصلی یونجه ایران ذکر شده دامنه تنوع ژنتیکی پائین است و گسترش پایه ژنتیکی ارقام نیازی جدی به شمار می‌رود. این نتایج با نتایج فلاحتی و همکاران (۱۳۸۴) مطابقت داشت. منگونی و همکاران نیز میزان تنوع ژنتیکی را با استفاده از مارکر

می‌گردد. مجموعه این عوامل سبب اختلاط و همپوشانی جمعیت‌ها و افزایش تشابه ژنتیکی گردیده است (فلاحی و همکاران، ۱۳۸۴). قابل ذکر است که میانگین بالای تشابه ژنتیکی ۰/۶۱ با توجه به اینکه ایران خاستگاه این گیاه می‌باشد چندان رضایت بخش نیست، و گسترش پایه ژنتیکی این محصول مهم نیازی جدی بشمار می‌آید. این نتایج با مطالعات فلاحی و همکاران (۱۳۸۴) منگونی و همکاران (۱۹۹۹) سمیعی و همکاران (۱۳۸۳) مطابقت داشت.

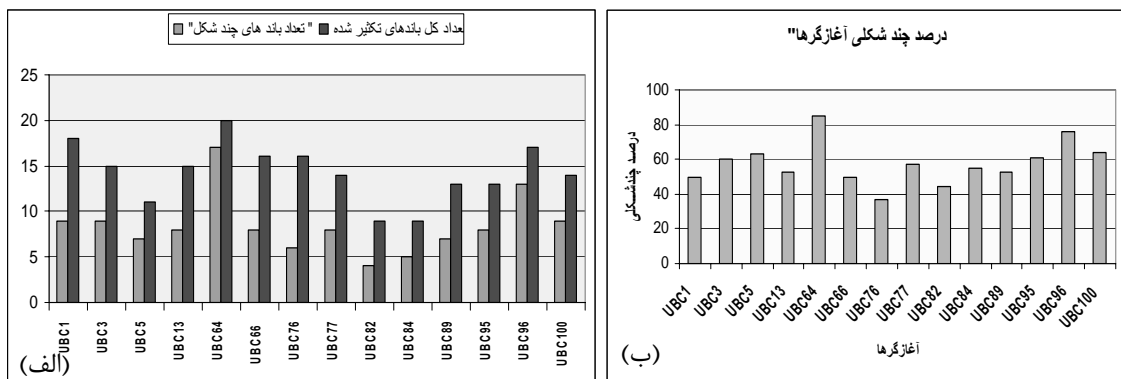
یکی از دلایل تشابه ژنتیکی بالا (تنوع ژنتیکی کم) احتمالا می‌تواند ناشی از ادغام و همپوشانی زیاد جمعیت‌های زراعی باشد که در نتیجه جریان ژنی در بین جمعیت‌ها حاصل شده است. به نظر می‌رسد جمعیت‌های مختلف مورد کشت توسط زارعین، با گذشت زمان با هم اختلاط یافته و در نتیجه جمعیت‌هایی متشکل از ژنوتیپ‌های مختلف بوجود آمده است. دلیل احتمالی دیگر اینکه جمعیت‌های زراعی یونجه دگرگشن بوده و میزان دگرگشتی بستگی به فعالیت حشرات گرده افشان دارد که این عامل نیز موقع گرده افشانی باعث انتقال گرده از یک جمعیت به جمعیت دیگر

جدول (۱): لیست نام و توالی پرایمری آنها همراه با تعداد باندهای تکثیری برای هر آغازگر

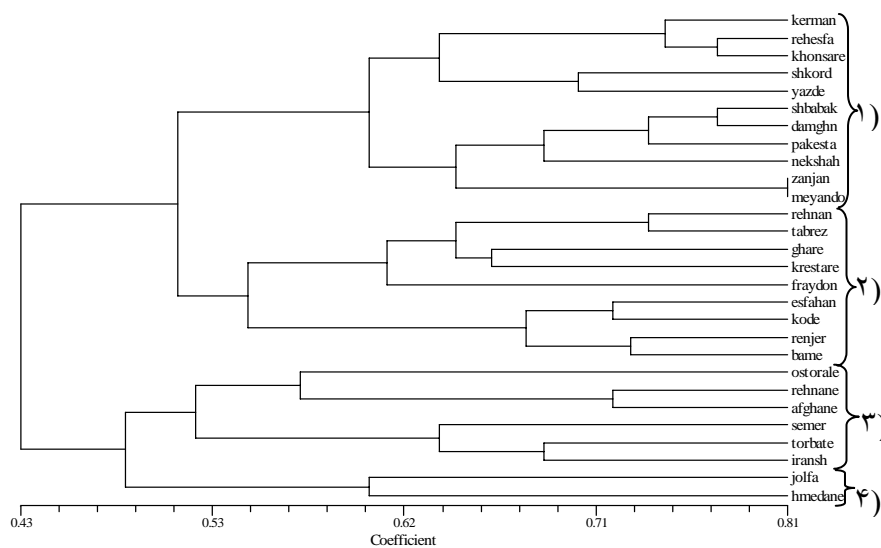
آغازگر	توالی ۳' → ۵'	تعداد باندهای تکثیرشده	تعداد باندهای چند شکل	تعداد باندهای یک شکل	درصد چند شکلی
UBC1	3' CCTGGGCTTC 5'	18	9	9	50
UBC3	3' CCTGGGCTTA 5'	15	9	6	60
UBC5	3' CCTGGGTTCC 5'	11	7	4	63
UBC13	3' CCT GGG TGG A 5'	15	8	7	53
UBC64	3' GAGGGCGGGA 5'	20	17	3	85
UBC66	3' GAGGGCGTGA 5'	16	8	8	50
UBC76	3' GAGCACCAGT 5'	16	6	10	37
UBC77	3' GAGCACCAGG 5'	14	8	6	57
UBC82	3' GGGCCCGAGG 5'	9	4	5	44
UBC84	3' GGG CGC GAG T 5'	9	5	4	55
UBC89	3' GGGGGGCTTGG 5'	13	7	6	53
UBC95	3' GGG GGG TTG G 5'	13	8	5	61
UBC96	3' GGC GGC ATG G 5'	17	13	4	76
UBC100	3' ATCGGGTCCG 5'	14	9	6	64
TOTAL		200	118	82	59



شکل ۱. تصویر مربوط به آغازگر UBC۸۹



شکل ۲- تعداد باندهای تکثیر شده (الف) و درصد چند شکلی آغازگرها (ب) در ارقام مورد مطالعه



شکل ۳- دندروگرام حاصل از روش Complete و ضریب تشابه تطابق ساده

می تواند از داده های مارکری تعیین و متنوع ترین ژنوتیپ ها به عنوان والدین ارقام ساختگی انتخاب گردند. با استفاده از مارکرهای پیوسته به ژن های کنترل کننده صفات مورد علاقه (مانند عملکرد) در انتخاب والدین از یک پایه ژنتیکی وسیع ممکن است که یک استراتژی روشن تری برای موفقیت در شناسایی والدین برتر بدست آید. از طرفی برای شناسایی گروه های هترو تیک بالقوه بر مبنای تنوع در نشانگرها طرحی پیشنهاد شده است (برومر ۱۹۹۹) که در آن انتخاب در داخل دو گروه به صورت مستقل انجام می شود. گیاهان برتر از هر گروه در ایزولاسیون تکثیر و برای تولید بذر پایه مورد استفاده واقع می شوند. در مرحله بعد در مزرعه این دو با هم مخلوط شده و بذر هیبرید تولید می شود. این روش اثر بزرگتری نسبت به حالت قبل در پیشرفت عملکرد می تواند داشته باشد، لازم به ذکر است که تفکیک در بین گروه های هترو تیک امری ضروری است. بدون شک در ادامه راه، مارکرهای مولکولی درک واضح تری از ژنوم مدیکاگو را در اختیار قرار خواهند داد. مطالعه مارکرهای مولکولی در یونجه نیاز به تمرکز بر چند عامل دارد: ۱) ساختار جامعه، ۲) میزان واکنش به انتخاب، ۳) اثر متقابل ژنوتیپ- محیط و ۴) انتخاب به کمک مارکر برای آل های چندگانه. در مطالعه حاضر ساختار جامعه مورد توجه بوده و عوامل دیگر نیاز به استفاده از نشانگرهای دیگر و همچنین بررسی های فنوتیپی در محیط ها و سال های مختلف دارد. تجربه و تحلیل نشانگرها همراه با داده های فنوتیپی می تواند منجر پیشرفت اساسی در روش های انتخاب و استراتژی اصلاحی گردد.

یکی از معمول ترین روش های تهیه ارقام یونجه تولید واریته های سینتیک یا ساختگی می باشد که مبتنی بر ژنوتیپ های با قدرت ترکیب پذیری عمومی بالا می باشد. با توجه به نتایج به دست آمده از این آزمایش ارقام ایرانی جلفا، تربتی، فریدونشهری، همدانی، و ایرانشهری، بالاترین فاصله ژنتیکی را با بقیه نشان دادند که با توجه به مطالعات تکمیلی می توان از این ارقام به عنوان والدین ارقام سنتتیک استفاده نمود. قابل ذکر است که بوشهری و سپاهی (۱۳۶۷) در یک برنامه سه ساله که به منظور قدرت ترکیب پذیری ارقام یونجه از نظر عملکرد و سایر خصوصیات مهم زراعی بر

به طور کلی به نژادی یونجه بعلت خودناسازگاری، مشکل بودن دورگ گیری و اثرات شدید سوء اینبریدینگ (خویش آمیزی) از مشکلاتی برخوردار است و نیاز به روش های اصلاحی خاصی دارد. توارث تترازومیک، پس روی اینبریدینگ شدید، تنوع ژنتیکی بالا و تجاری سازی ارقام ساختگی استفاده از مارکرهای مولکولی در برنامه های اصلاحی را با محدودیت مواجه می کند (برومر و همکاران ۱۹۹۴). بسیاری از مطالعات حکایت از نتایج متناقض کاربرد تنوع ژنتیکی در انتخاب والدین هیبریدها و یا ارقام ساختگی دارد به طوری که تخمین دقیق عملکرد نتاج در بسیاری از حالات با مشکل مواجه بوده است. (گودشالک و همکاران ۱۹۹۰، لی و همکاران ۱۹۸۹). بطور مثال در یک مطالعه با استفاده از مواد اصلاحی والدی هیچ رابطه واضحی در بین جوامع حاصل از اعضای متفاوتی که بر اساس تشابه RFLP انتخاب شده بود مشاهده نگردید (کیدول و همکاران ۱۹۹۹). همچنین اسلج و همکاران (۱۹۹۸) با استفاده از یک ژرم پلاسما فاقد خواب^۱ بنام CUF₁₀₁ و با استفاده از نشانگرهای AFLP و میزان دوری ژنتیکی، از یک جامعه ۱۲۰ عضوی ۱۲ و ۲۴ والد را انتخاب کردند. این محققین عملکرد واریته های ساختگی حاصل از ۱۲، ۲۴ و ۱۲۰ ژنوتیپ ها را مقایسه کردند و هیچ تغییری در واکنش های دفاعی این جوامع با محدود کردن ۱۲۰ به ۱۲ عضو مشاهده نکردند.

دلیل عمده این امر آن است که استفاده از مارکرهای تصادفی در بعضی از آنالیزها مشکلاتی به همراه دارد و خطاهای بسیار زیادی را در آنالیزها وارد می کند، به این دلیل که بسیاری از ژن های مورد علاقه به مارکرها پیوسته نمی باشند و یا اینکه پایه ژنتیکی مواد آزمایشی محدود می باشد. باین وجود مارکرها ممکن است به عنوان ابزاری جهت شناسایی والدین برتر برای تهیه جوامع یا ارقام مفید واقع گردد. در این راستا و با کشف وجود رابطه بین فاصله ژنتیکی و عملکرد علوفه در یونجه تتراپلوئید توسط کیدول و همکاران (۱۹۹۴) این امید پیدا شد که مارکرها می توانند در انتخاب والدین در یک برنامه اصلاحی یونجه مفید واقع شوند. نتیجه اینکه تشابه یا دوری ژنتیکی گروهی از والدین بالقوه

^۱ Nondormant

8. Brown, D.E. and Bingham ET,(1994). Selfing in an alfalfa seed production field. *Crop Sci* 34: 1110-1112
9. Brummer, E. C. (1999). Capturing hetrosis in forage crop cultivar development. *Crop Sci*. 939-943.
10. Brummer, E. C., G. Kochert and J. H. Botoun .(1991). RFLP variation in diploid and tetraploid alfalfa (*Medicago sativa L.*). *Theor. Appl. Genet.* 83:89-96.
11. Brummer, E. C., J. H. Botoun and G. Kochert. (1995). Analysis of annual *Medicago* species using RAPD markers. *Genome*. 38: 362-367.
12. Brummer, E. C., Sledge, M. K., Bouton J. H., and G. Kochert.(1994). Molecular marker analysis in alfalfa and related species. pp: 169-180. In: Phillips, R. L., and I. K. (eds), DNA-based markers in plants. Kluwer academic publishers-Dordrecht/Boston/London.
13. Echt CS, Kidwell KK, Knapp SJ, Osborn TC, McCoy TJ (1994) Linkage mapping in diploid alfalfa (*Medicago sativa*). *Genome*37:61-71.
14. Fajoulot, S., Ronfort, J., Baudoin, P., Barre P., Haguët, C. and Julier B. (2005). Genetic diversity among alfalfa (*Medicago sativa*) cultivars coming from a breeding program, using SSR markers. *Theor. Appl. Genet.* 111(7): 1420-1429.
15. Farshadfar, M., Farshadfar, E. (2008). Genetic variability among lucerne cultivars based on biochemical (SDS-PAGE) and morphological markers. *Journal of applied sciences*. 8(10): 1867-1874.
16. Ghérardi, M., Mangin, B., Goffinet, B., Bonnet, D., and Huguët, T. (1998). A method to measure genetic distance between allogamous populations of alfalfa (*Medicago sativa*) using RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 96: 406-412.
17. Godshalk, E.B., Lee, M., and Lamkey, K.R.(1990) Relationship of restriction fragment length polymorphism to single-cross hybrid performance in maize. *Theor Appl Genet.* 80:273-280.
18. Kidwell KK, Bingham ET, Woodfield DR, Osborn TC (1994b) Relationships among genetic distance, forage yield, and heterozygosity in isogenic diploid and tetraploid alfalfa populations. *Theor Appl Genet* 89:323-328.
19. Kidwell, K.K., Austin, D.F., and Osborn T.C. (1994b). RFLP evaluation of nine *Medicago* accessions representing the original germplasm sources for North American alfalfa cultivars. *Crop Sci*. 34: 230-236.
20. Kiss GB, Csanádi G, Kálmán K, Kaló P, Ökrész L (1993) Construction of a basic genetic map for alfalfa using RFLP, RAPD, isozyme, and morphological markers. *Mol Gen Genet* 238:129-137.

روی بذور حاصل از پلی کراس ۱۵ رقم یونجه انجام دادند و ۶ رقم ایرانی به عنوان کاندیدای تولید رقم سینتتیک را معرفی نمودند که در بین آنها دو رقم برتر این آزمایش یعنی ارقام ایرانشهری و همدانی نیز قرار داشتند. این دو از جمله ارقام هستند که کمترین میزان میانگین تشابه ژنتیکی را با دیگر ارقام مورد آزمایش در بررسی حاضر نیز دارا بودند.

منابع

۱. سمعی، ک. (۱۳۸۳) بررسی تنوع ژنتیکی در شیدر با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی و مولکولی. پایان نامه کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان.
۲. شاه نجات بوشهری، ع. (۱۳۸۵). بیوتکنولوژی مولکولی و تولید مواد غذایی گیاهی. انتشارات نقش مهر. ۸۲۵ ص.
۳. شاه نجات بوشهری، ع. و ع. سپاهی. (۱۳۷۰) ارزیابی قدرت ترکیب پذیری عمومی ۱۵ رقم یونجه زراعی. *مجله علوم کشاورزی ایران*. جلد ۱۵، شماره ۱ و ۲، ص ۷۰-۸۸.
۴. فلاحتی، ع.، حبشی، ع.، اصفهانی، م. محمدی، س. و ب. قره یاضی. (۱۳۸۴). ارزیابی ساختار و تنوع درون و بین جمعیتی یونجه های زراعی (*Medicago sativa L.*) ایران با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره. *مجله علوم کشاورزی ایران*. جلد ۳۶، شماره ۴: ۹۸۹-۹۷۹
۵. کریمی (۱۳۶۹). یونجه. انتشارات دانشگاه تهران. چاپ اول. ص ۲۱-۷
۶. کوچکی، ع. و ع. ریاضی، (۱۳۵۷). مقایسه ۶ رقم یونجه از لحاظ خصوصیات مورفولوژیکی و میزان عملکرد. *مجله علوم کشاورزی ایران*، جلد دوم شماره های (۲ و ۳): ۲۵-۲۹.
۷. یزدی صمدی، ب. (۱۳۷۱). بررسی ارقام یونجه از لحاظ صفات مهم زراعی در کرج. *مجله علوم کشاورزی ایران* ۲۵ (۲): ۳۱-۱۹

21. Knapp, E. E. and Teuber, L. R. (1993) Outcrossing rate of alfalfa population differing in ease of floret tripping. *Crop Sci* 33: 1181-1185.
22. Lee, M., Godshalk, E.B., Lamkey, K.R. and Woodman, W.W. (1989). Association of restriction fragment length polymorphisms among maize inbreds with agronomic performance of their crosses. *Crop Sci* 29: 1067-1071.
23. Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* 27:209-220.
24. McCoy T, J. and Echt C, S.(1993) Potential of trispecies bridge crosses and random amplified DNA makers for introgression of *Medicago dzhawakhetica* and *M. pironae* germplasm into alfalfa (*M. sativa*). *Genome* 36: 594-601.
25. McCoy T, J. and Smith, L. Y. (1986) Interspecific hybridization of perennial *Medicago* species using ovule-embryo culture. *Theor. Appl. Genet* 71: 772-783
26. Mengoni.A. , A. Gori and M. Bazzicalupo.(1999). Use of RAPD and microsatellite (SSR) variation to assess genetic relationships among populations of tetraploid alfalfa, *Medicago sativa*. *Plant Breeding*.119: 311-317.
27. Musial, J. M., K. E. Basford and J. A. G. Irwin. (2002). Analysis of genetic diversity within Australian Lucerne cultivars and implications for future genetic improvement. *Aust. J. Agri. Res.* 53: 629-636.
28. Pupili, F., Businelli, S., Cacenes, M.E., Damiani, F. and Arcioni, S. (1995) Molecular cytological and morpho-agronomical characterization of hexaploid somatic hybrids of *Medicago*. *Theor. Appl. Genet* 90: 347-355.
29. Rohlf, F. J. (1990). NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Ver. 2.02. Exeter software, Setauket, New York.
30. Saghai-Maroo MA, Soliman KM, Jorgensen RA, Allard RW. (1984) Ribosomal spacer length polymorphism in barley: mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 1757-1761.
31. 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.
32. Seidman, L. A. (2008). Basic laboratory calculations for biotechnology. Pearson Pub. P. 482.
33. Sledge, M.K., Bouton, J.H, and Kochert, G.(1998) Molecular Marker Diversity as a Means of Selecting Parents for Synthetic Cultivars. *Proc. North Amer. Alfalfa Impr. Conf.* :73-74 Bozeman, MT. 1-6 Aug.
34. Sokal, R. R., and C. D. Michner. 1958. A statistical method for evaluating systematic relationships. *Univ. Kons. Sci. Bull.*, 38: 1409-1438.
35. Sledge, MK., Ray, IM., and Jiang G. 2005. An expressed sequence tag SSR map of tetraploid alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 111: 980- 992.
36. Williams ,J.G. k., A. R. Kubelik , K.J. Livak , J. A. Rafalski & S.V. Tingey (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531- 6530.
37. Williams,J.G.K.,M.K.Hanafey.,J.A.Rafalaski and S.V.Tingey.(1993) Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods Enzymol.*218:704-740.
38. Yu, K., and K.P. Pauls. (1993). Rapid estimation of genetic relatedness among heterogeneous populations of alfalfa by random amplification of genomic DNA samples. *Theor. Appl. Genet.* 86:788-794.