بررسی تنوع ژنتیکی و روابط خویشاوندی یونجه‌های یک‌ساله دیپلوئید و تتراپلوئید با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره

محسن فلاحتی عنبران[۱]، علی‌اکبر حبشی[۱]، مسعود اصفهانی[۲]، سید ابوالقاسم محمدی[۳] و بهزاد قره‌یاضی[۱]

چکیده

یونجه‌های یک‌ساله از خویشاوندان نزدیک یونجه زراعی بوده که به منظور تولید علوفه، حفاظت خاک، تناوب زراعی، تثبیت بیولوژیک ازت و کود سبز مورد استفاده قرار می‌گیرند. در این تحقیق تنوع ژنتیکی درون و بین گونه‌ای و روابط خویشاوندی ۴ گونه یونجه یک‌ساله دیپلوئید (*M. truncatula*، *M. rigidula*، *M. orbicularis* و *M. minima*) و دو گونه یک‌ساله تتراپلوئید (*M. rugosa* Desr. و *M. scutellata* Mill.) مورد بررسی قرار گرفت. دی‌ان‌آی ژنومی استخراج شده از نمونه‌های گیاهی با ۶ جفت آغازگر ریزماهواره تحت واکنش زنجیره‌ای پلیمراز قرار گرفته و محصولات آنها روی ژل پلی‌آکریل‌آمید واسرشته‌ساز الکتروفورز شدند. نتایج به دست آمده نشان داد که مجموعاً ۲۵ آلل چند شکل در بین گونه‌های مورد مطالعه وجود داشت. میانگین تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای از صفر در دو گونه *M. rugosa* و *M. scutellata* Mill. تا ۰/۱۱۴ در گونه *M. minima* متغیر بود. تنوع ژنتیکی کل به تنوع درون و بین گونه‌ای با استفاده از تجزیه واریانس مولکولی تفکیک گردید. بر اساس نتایج به دست آمده تنوع ژنتیکی درون و بین‌گونه‌ای در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار و میزان تنوع بین‌گونه‌ای به مراتب بیشتر از تنوع درون گونه‌ای بود. مقایسه فاصله دو به دوی گونه‌ها نشان داد که تفاوت معنی‌داری در بین تمام گونه‌های مورد بررسی وجود دارد. تجزیه خوشه‌ای با استفاده از روش دورترین همسایه و تجزیه به مؤلفه‌های اصلی دو گونه تتراپلوئید *M. rugosa* و *M. scutellata* Mill. را در یک گروه قرار داد که نشان دهندهٔ احتمال وجود جد مشترک برای این دو گونه می‌باشد. این دو گونه در تمام جایگاه‌ها به استثنای AFca16 دارای الگوی باندی مشابه بودند.گونه‌های دارای غلاف درشت و صاف دارای تنوع ژنتیک کمتری نسبت به گونه‌های غلاف ریز و خاردار بودند که احتمالاً اندازه و خاردار بودن غلاف نقش مهمی در تکامل یونجه‌های یک‌ساله داشته است. این پژوهش نشان داد که نشانگرهای ریزماهواره در تعیین میزان تنوع ژنتیکی درون و بین گونه‌ای و روابط خویشاوندی و تکاملی گونه‌های یونجه کارایی بالایی دارند.

واژه‌های کلیدی: یونجه‌های یک‌ساله(*Medicago* spp.)، تنوع ژنتیکی، نشانگرهای ریزماهواره، تجزیه واریانس مولکولی

۱. به ترتیب مربی و استادیاران مؤسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی، کرج

۲. استادیار زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

۳. استادیار زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

[Downloaded from iutjournals.iut.ac.ir on 2024-05-18]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1385.10.3.28.7]

مقدمه

یونجه‌های یک‌ساله (*Medicago* spp.) از خویشاوندان نزدیک یونجه زراعی (*Medicago sativa* L.) هستند که بومی مناطق مدیترانه‌ای می‌باشند. یونجه‌های یک‌ساله دارای رشد سریع بوده و علوفه مطلوبی تولید می‌نمایند. این گیاهان قادر به تثبیت بیولوژیک ازت بوده و برای جلوگیری از فرسایش خاک نیز مفیدند. در بیشتر کشورها از این گیاهان برای تولید کود سبز و علوفه (به‌عنوان چراگاه برای دام) استفاده می‌گردد. این گونه‌ها دارای ژن‌های مفید زیادی از جمله ژن دخیل در مقاومت به تنش‌های زیستی و غیر زیستی می‌باشند. به طور مثال *M. scutellata* Mill. و *M. rugosa* Desr. نسبت به آفات از جمله سرخرطومی و برگخوار سیب‌زمینی مقاومت طبیعی دارند زیرا کرک‌های غده‌دار سطح ساقه، برگ‌ها و غلاف‌ها را پوشیده است. به خاطر اهمیت خیلی زیاد یونجه در حال حاضر از این گیاه به‌عنوان گیاه مدل برای خانواده بقلات استفاده می‌گردد (۱۲).

جنس *Medicago* دارای ۵۶ گونه بوده که ۲۲ گونه چندساله و دگرگشن (از جمله گونه زراعی *M. sativa*) و ۳۴ گونه یک‌ساله خودگشن می‌باشد. اکثر گونه‌های چندساله تتراپلوئید (۲n= ۴x= ۳۲) بوده ولی تعدادی از آنها دیپلوئید (۲n= ۲x= ۱۶) نیز می‌باشند و تنها دو گونه *M. saxatillis* M. B. و *M. cancellata* M. B. هگزاپلوئید (۲n= ۶x= ۴۸) هستند. گونه‌های یک‌ساله دارای ۲n=۲x= ۱۶ بوده به استثنای اینکه چهار گونه *M. murex* Willd. *M. praecox* DC. و *M. polymorpha* L. دارای ۲n= ۲x= ۱۴ *M. rigidula* Desr. هستند و *M. scutellata* Mill. و *M. rugosa* Desr. تنها گونه‌های یک‌ساله تتراپلوئید با ۲n= ۴x= ۳۰ می‌باشند (۱۴).

استفاده مؤثر از منابع ژنتیک و ذخائر توارثی گیاهان زراعی نیازمند اطلاع از تنوع و ساختار ژنتیک (هم از نظر زمانی و هم از نظر فاصله‌ای) آنها می‌باشد. به این منظور محققین از نشانگرهای مختلفی مانند مورفولوژیک، سیتوژنتیک، و مولکولی استفاده کرده‌اند. نشانگرهای مورفولوژیک علی‌رغم کارایی بالا در تشخیص و طبقه‌بندی گونه‌ها، به علت تأثیرپذیری از محیط، کارآیی کمتری در تعیین میزان تنوع ژنتیکی دارند. نشانگرهای مولکولی همچون تفاوت طول قطعات حاصل از هضم (Restriction Fragment Length Polymorphism) (RFLP) و چند شکلی قطعات حاصل از تکثیر تصادفی (Random Amplified Polymorphic DNA) (RAPD) برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در داخل جمعیت‌ها و گونه‌های گیاهی مختلف مفید واقع شده‌اند. برای ارزیابی میزان تنوع ژنتیکی و روابط خویشاوندی جمعیت‌های زراعی و شناسایی ارقام یونجه‌های چندساله *M. sativa* از نشانگر RFLP استفاده شده است (۱۰، ۱۷ و ۱۹). اولین بار برومر و همکاران میزان تنوع ژنتیکی را در داخل و بین چند گونه یک‌ساله یونجه با استفاده از نشانگر RAPD مورد بررسی قرار دادند (۱۱). علاوه بر گونه‌های یک‌ساله، از نشانگر رپید برای ارزیابی میزان تنوع ژنتیکی یونجه‌های چندساله و تمایز جمعیت‌های زراعی و طبیعی یونجه نیز استفاده شده است (۱۶ و ۲۱) از این نشانگرها هم‌چنین برای بررسی میزان دگرگشنی و تنوع در یونجه‌های یک‌ساله از جمله *M. polymorpha* (۲۵) و *M. truncatula* GAERTN (۹) استفاده شده است. مطالعات زیادی نیز به منظور بررسی روابط تکاملی گونه‌های یک‌ساله جنس *Medicago* با استفاده از فاصله‌دهنده‌های درون ریبوزومی (ITS1 و ITS2) و خارج ریبوزومی (ETS) انجام گرفته است (۴، ۵ و ۶). نشانگرهای ریزماهواره از جمله نشانگرهای ژنتیکی هم‌بارز و چندآللی هستند که در ژنوم موجودات به طور فراوان وجود دارند. به‌علت ماهیت تنوع بالای توالی‌های ریزماهواره‌ای در ژنوم، در حال حاضر نشانگرهای ریزماهواره برای اکثر گونه‌های گیاهی شناسایی و معرفی شده‌اند که برای اهداف مختلفی از جمله مطالعه تنوع ژنتیکی و روابط تکاملی درون و بین گونه‌ای به کار برده شده‌اند.

ریزماهواره‌ها توالی‌های ۶-۱ جفت بازی هستند که پشت سر هم تکرار شده (۲۴) و به‌علت جهش زیاد از تنوع قابل ملاحظه‌ای حتی در بین افراد یک جمعیت برخوردار می‌باشند.

[Downloaded from iutjournals.iut.ac.ir on 2024-05-18]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1385.10.3.28.7]

جدول ۱. منشا، سطح پلوئیدی و میانگین تنوع ژنتیک در گونه‌های یک‌ساله یونجه

گونه	سطح پلوئیدی	منشا	میانگین تنوع ژنتیک
M. truncatula	۲n=۲x =۱۶	کازرون	۰/۰۶۷
M. orbicularis	۲n=۲x =۱۶	کرمانشاه	۰/۰۶۷
M. minima	۲n=۲x =۱۶	کرمانشاه	۰/۱۳
M. rigidula	۲n=۲x =۱۴	اردبیل	۰/۱۰
M. rugosa	۲n=۴x =۳۰	خراسان	۰/۰۰
M. scutellata	۲n=۴x =۳۰	گرگان	۰/۰۰
میانگین			۰/۰۶

نشانگرهای ریزماهواره یا توالی‌های ساده تکراری (Simple Sequence Repeat) (SSR) به علت ماهیت هم‌بارزی، امتیازبندی آسان و محل ژنومی مشخص، ابزار بسیار مناسبی برای تعیین سطح تنوع ژنتیک، شناسایی و تفکیک ارقام و مدیریت مجموعه‌های ذخایر توارثی هستند.

اولین بار ۴ جایگاه ریزماهواره‌ای در یونجه بوسیله دیوان و همکاران در سال ۱۹۹۷ معرفی شدند (۱۴) و منگونی و همکاران از این نشانگرها برای مطالعه روابط ژنتیک بین اکوتیپ‌های زراعی یونجه استفاده کردند (۲۱). علاوه بر جایگاه‌های فوق شش جایگاه ریزماهواره دیگر نیز توسط دیوان و همکاران (۲۰۰۰) برای تهیه نقشه ژنتیک در یونجه استفاده گردید (۱۵). باکوریزو و همکاران اولین بار ۹ جایگاه ریزماهواره را در یونجه یک‌ساله و مدل *M. truncatula* معرفی کردند (۱) و بونین و همکاران (۲۰۰۱) تعدادی از این جایگاه‌ها را برای بررسی ساختار فاصله‌ای و تنوع ژنتیک داخل جمعیتی در گونه *M. truncatula* استفاده کردند (۹). نشانگرهای ریزماهواره ابزار مناسبی برای تمایز ارقام و اکوتیپ‌های زراعی می‌باشند. یکی از ویژگی‌های بارز این نشانگرها تفکیک گیاهان هتروزیگوت از هموزیگوت است.

تخمین میزان تنوع ژنتیکی به‌عنوان یکی از گام‌های پایه‌ای و اساسی در نگه‌داری و حفاظت مواد ژنتیک در بانک بذر و اجرای برنامه‌های به نژادی است. تجربیات محققین مختلف، اهمیت و کارایی بالای اطلاع از میزان تنوع و ساختار ذخایر توارثی در مدیریت بهینه ذخایر ژنتیک نشان داده است. بدیهی است که داشتن اطلاعات کامل از میزان تنوع ژنتیک، قدم اول در مدیریت مؤثر منابع ژنتیک و ذخایر توارثی گیاهی می‌باشد و با فهم ساختار ژنتیک گونه‌های وحشی، اصلاح‌گران قادر به شناسایی و بهره‌برداری بهتر از تنوع در برنامه‌های اصلاحی و هم‌چنین قادر به مدیریت مؤثر منابع ژنتیک از طریق تعیین حجم نمونه‌های ذخایر توارثی برای نگه‌داری در بانک ژن یا بذر و شناسایی همنامی و ترادف‌ها خواهند بود. این تحقیق به منظور تعیین سطح تنوع ریزماهواره‌های هسته‌ای در داخل و بین گونه‌های وحشی، روابط تکاملی بین این گونه‌ها و هم‌چنین مقایسه تنوع گونه‌های یک‌ساله دیپلوئید با تتراپلوئید یونجه انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در جدول ۱ خصوصیات گونه‌های یونجه یک‌ساله مورد استفاده از جمله سطح پلوئیدی، تعداد کروموزوم و منشا آنها ذکر شده است. از هر گونه یک جمعیت مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. بذرهای گونه‌های مذکور ابتدا در ظروف پتری جوانه‌دار شده (به علت سختی پوسته بذر این گونه‌ها خراش دهی بذرها نیز انجام شد) و سپس به گلدان منتقل شدند. پس از رشد گیاهچه‌ها در گلخانه از هر گونه ۵ نمونه به طور تصادفی انتخاب و از برگ‌های سالم و سبز هر گیاه نمونه‌برداری انجام شد. برگ‌های جمع‌آوری شده پس از انجماد با ازت مایع به فریزر ۸۰°C- منتقل شدند. استخراج دی‌انآ بر اساس روش

[Downloaded from iutjournals.iut.ac.ir on 2024-05-18]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1385.10.3.28.7]

جدول ۲. تعداد آلل، میانگین تعداد آلل در هر گیاه، دامنه اندازه آلل‌ها، شاخص تثبیت و درصد تنوع درون و بین جمعیتی در جایگاه‌های ریزماهواره

جایگاه	تعداد کل آلل‌ها	دامنه اندازه آلل (جفت باز)	میانگین تعداد آلل در هر گیاه	درصد تنوع		شاخص تثبیت (Fst)[1]
				درون گونه‌ای	بین گونه‌ای	
AFct32	۳	۱۰۵ –۱۱۳	۱	۰	۱۰۰	۱
AFca11	۳	۱۳۰ –۱۵۱	۱	۱۵	۸۵	۰/۸۴
AFca16[2]	۷	۸۹ –۱۵۷	۱/۳۳	۰	۱۰۰	۱
AFctt1	۴	۱۰۰ –۱۱۷	۱	۱۹	۸۱	۰/۸۱
AFct45	۵	۱۲۹ –۱۴۲	۱	۸	۹۲	۰/۹۲
MTLEC2A	۳	۹۷ –۱۹۳	۱	۱۰	۹۰	۰/۹۰

۱. Fixation index، ۲. این جایگاه در گونه *M. rigidula* دارای ۲ آلل به طول ۱۱۷ و ۱۵۷ جفت باز و در گونه *M. rugosa* نیز ۲ آلل به طول ۸۹ و ۹۵ جفت باز داشت و درحالی که در گونه‌های دیگر دارای ۱ آلل با طول متفاوت برای هر گونه بود.

پیشنهادی دلاپورتا و همکاران با مقداری تغییرات انجام گردید (۱۳).

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

شش نشانگر ریزماهواره معرفی‌شده توسط دیوان و همکاران برای بررسی چندشکلی در گونه‌های وحشی استفاده گردید (جدول ۲). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به حجم ۱۵ میکرو لیتر حاوی بافر PCR ۱۰ برابر (شامل ۵۰ میلی‌مولار کلرید پتاسیم، ۱۰ میلی‌مولار تریس- اسیدکلریدریک و ۰/۰۱٪ ژلاتین)، ۲ میلی‌مولار کلرور منیزیم، ۱/۵ واحد تک دی‌ان‌آ پلیمراز، ۲۰ پیکو مول از هر آغازگر، ۰/۲ میلی‌مولار از هر dNTP و ۲۰ نانوگرم از دی‌ان‌آی ژنومی هر گیاه انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در دستگاه ترمال سایکلر Perkin Elmer مدل ۹۷۰۰ با برنامه زمانی ۵ دقیقه واسرشته‌سازی اولیه در ºC ۹۴، ۱۰ چرخه اولیه به صورت Touchdown (به طوری که دمای اتصال را ۱۰ درجه بالاتر از دمای اتصال واقعی درنظر گرفته و به ازای هر چرخه ۱ درجه از دما کاسته می‌شود) و ۲۵ چرخه شامل ۳۰ ثانیه در ºC ۹۴ (جهت واسرشته‌سازی)، ۳۰ ثانیه در ºC ۵۲ (جهت اتصال آغازگرها) و ۳۰ ثانیه در ºC ۷۲ (جهت بسط) انجام گردید و بسط نهایی در ºC ۷۲ به مدت ۵ دقیقه انجام شد. فرآورده‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به نسبت مساوی با رنگ فورمامید (۹۸ درصد) مخلوط و مقدار ۵ میکرولیتر از آن بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید واسرشته‌ساز استاندارد ۶ درصد (در دستگاه Squi-Gen GT، Bio Rad) بارگذاری و با توان ثابت ۹۰ وات به مدت ۴۵-۳۰ دقیقه بسته به طول جایگاه‌ها الکتروفورز انجام و رنگ‌آمیزی ژل با استفاده از روش نیترات نقره انجام شد (۲).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

امتیازدهی باندها به صورت ۱ برای وجود باند و صفر برای عدم وجود باند انجام گرفت. میانگین تنوع ژنتیکی درون‌گونه‌ای با محاسبه میانگین تعداد تفاوت‌های دوبه‌دو در هر جایگاه برآورد گردید. ماتریس وجود و عدم وجود باند (۱ و ۰) برای محاسبه ماتریس فاصله اقلیدسی استفاده گردید و این ماتریس برای انجام تجزیه واریانس مولکولی (Analysis of Molecular Variance) (AMOVA) به منظور محاسبه اجزای واریانس بین گیاهان داخل گونه‌ها و بین گونه‌ها به‌کار برده شد (۱۸). فاصله دو به دوی گونه‌ها بر اساس

[Downloaded from iutjournals.iut.ac.ir on 2024-05-18]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1385.10.3.28.7]

شاخص تثبیت (Fixation index) محاسبه و با ۱۶۰۰۰ جایگشت تصادفی مورد آزمون قرار گرفت. پارامترهای مربوط به ساختار ژنتیکی گونه‌ها با استفاده از نرم‌افزار Arlequin 2.000 (۲۳) محاسبه شدند. روابط ژنتیکی بین گونه‌ها با ترسیم دندروگرام با استفاده از الگوریتم دورترین همسایه (Complete link) و تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بر اساس ضریب تشابه جاکارد، با نرم افزار NTSYS-pc 2.02 (۲۲) مشخص گردید.

نتایج و بحث

چندشکلی نشانگرهای ریزماهواره

چندشکلی جایگاه‌های ریزماهواره در یک جمعیت از هر گونه و ۵ گیاه از هر جمعیت بررسی گردید. تمام ۶ جایگاه ریزماهواره به‌کاررفته بین گونه‌ها چندشکلی نشان دادند. در جدول ۲ تعداد کل آلل‌ها، میانگین تعداد آلل، اندازه تقریبی آلل‌ها، شاخص تثبیت و درصد تنوع درون و بین جمعیتی به تفکیک برای هر جایگاه نشان داده شده است. تعداد ۲۵ آلل در مجموع ۶ جایگاه ریزماهواره در گونه‌های مورد بررسی مشاهده شد، به طوری که جایگاه AFca16 با ۷ آلل دارای بیشترین و نشانگر MTLEC2A با ۳ آلل دارای کمترین تعداد آلل در بین نشانگرهای مورد استفاده بودند. جایگاه MTLEC2A قسمتی از ژن لکتین ۲ در گونه *M. truncatula* می‌باشد که دارای هسته مرکزی تکراری $(AT)_{19}$ بوده که توالی آن در بانک ژن موجود است. نتایج نشان دادند که این جایگاه در *M. truncatula* از تنوع قابل ملاحظه‌ای برخوردار می‌باشد. در گونه‌های تتراپلوئید *M. scutellata* و *M. rugosa* این جایگاه فاقد تنوع بودند. به طوری که آلل‌های تکثیر شده این جایگاه در دو گونه مذکور دارای طول مشابهی (با طول تقریبی ۹۷ جفت باز) بودند که از نظر طول با گونه *M. truncatula* (با طول ۱۹۳-۱۹۱ جفت باز) تفاوت داشتند. برای این جایگاه در گونه‌های *M. rigidula*، *M. orbicularis* و *M. minima* حتی در دمای مختلف اتصال آغازگر تکثیر دیده نشد که این امر احتمالاً می‌تواند نتیجه حذف یا تغییر قسمتی از ژن لکتین ۲ در طول دوره تکاملی آنها باشد.

در بین نشانگرهای مورد بررسی AFct32 و AFca16 با ۱۰۰ درصد و نشانگر AFctt1 با ۱۹ درصد به ترتیب بیشترین تنوع بین گونه‌ای و درون گونه‌ای را دارا بودند. در صورتی‌که هدف، تمایز گونه‌های وحشی از هم باشد می‌توان جایگاه‌های با شاخص تثبیت (Fst) بالا را به این منظور انتخاب نمود. تعداد آلل دیده شده در هر گیاه در اکثر گونه‌های مورد بررسی به استثنای این که گونه *M. rugosa* و *M. rigidula* در جایگاه AFca16 دارای ۲ آلل بودند، برابر ۱ بود. الگوی باندی حاصل از این جایگاه برای همه گونه‌های مورد بررسی منحصر به فرد بود به طوری که این جایگاه به تنهایی تمام گونه‌ها را از هم متمایز و تفکیک نمود. وجود یک نوع آلل در اکثر گونه‌های مورد بررسی نشان‌دهنده همگنی و خلوص ژنتیکی بالای جمعیت‌های داخل هر گونه در جایگاه‌های ریزماهواره‌ای می‌باشد که این پدیده به سیستم آمیزشی یونجه‌های یک‌ساله نسبت داده می‌شود. زیرا که اکثر گونه‌های یک‌ساله خودگشن بوده و از سطح پلوئیدی پایینی نسبت به گونه‌های تتراپلوئید برخوردارند، به طوری که خودگشنی باعث کاهش هتروزیگوسی و افزایش فراوانی گیاهان خالص در جمعیت‌های داخل هر گونه شده است.

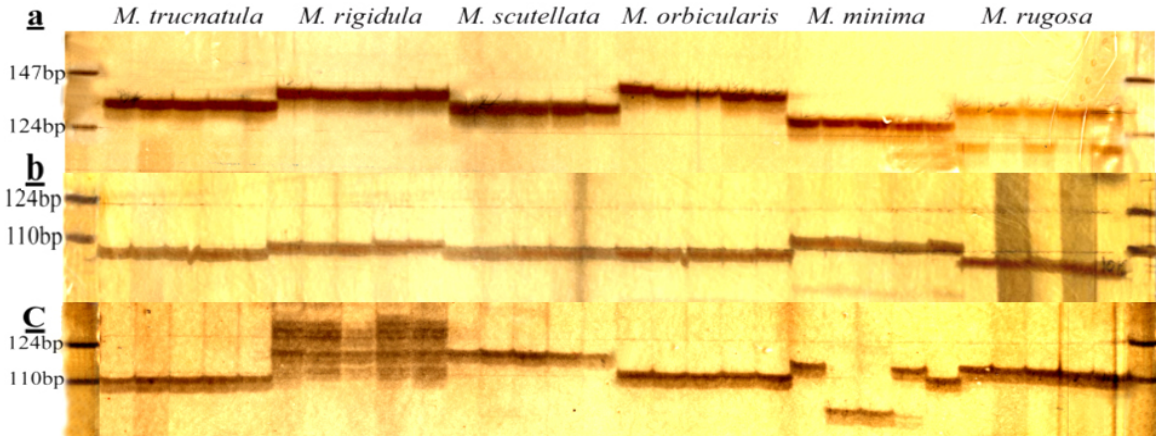
شکل ۱ وجود چندشکلی در تعدادی از جایگاه‌های ریزماهواره (AFct45، AFca32 و AFctt1) را در بین گونه‌های مورد بررسی نشان می‌دهد. وجود تنها یک نوع آلل در اکثر نمونه‌های داخل هر گونه بیانگر عدم وجود تنوع درون گونه‌ای در جایگاه مورد بررسی و وجود یک آلل در هر گیاه نشان‌دهنده هموزیگوت بودن گیاهان درون گونه‌ها می‌باشد.

تنوع ژنتیک درون گونه‌ای

در جدول ۱ برآورد میانگین تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای نشان داده شده است. گونه *M. minima* با میانگین ۰/۱۳ بیشترین تنوع را در بین گونه‌های مورد بررسی داشت و دو گونه تتراپلوئید *M. scutellata* و *M. rugosa* فاقد تنوع بودند. دو

[Downloaded from iutjournals.iut.ac.ir on 2024-05-18]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1385.10.3.28.7]



شکل ۱. چند شکلی درون و بین‌گونه‌ای یونجه‌های یک‌ساله در تعدادی از جایگاه‌های ریزماهواره(a: AFct45، b: AFca32 و c: AFctt1). نمونه‌ای از تنوع درون گونه‌ای در گونه *M. minima* در جایگاه AFctt1 دیده می‌شود.

گونه *M. truncatula* و *M. orbicularis* تنوع ژنتیکی (با میانگین ۰/۰۶) مشابهی را نشان دادند.

تنوع ژنتیکی کم درون گونه‌های وحشی نشان‌دهنده هتروزیگوسیتی پایین آنها بوده که از ماهیت خودگشنی این گونه‌ها ناشی می‌گردد. با توجه به این که یونجه‌های یک‌ساله خودگشن هستند، در رابطه با مشاهده مقداری تنوع در تعدادی از این گونه‌ها می‌توان گفت که یا این تنوع در هنگام پیدایش هر گونه تثبیت شده یا این که این گونه‌ها دارای مقداری دگرگشنی نیز می‌باشند. در هر صورت برای فهم دقیق علت این امر بایستی مطالعات تکمیلی صورت گیرد. در رابطه با وجود تنوع درون گونه‌ای *M. truncatula* نتایج مشابهی با استفاده از نشانگرهای رپید (۷، ۸ و ۱۱) و نشانگرهای ریزماهواره (۹) گزارش شده است.

مقایسه میزان تنوع ژنتیک با تغییرات اندازه و شکل غلاف هر گونه نشان داد که بین آنها رابطه وجود دارد، بدین ترتیب که گونه‌های دارای غلاف بدون خار تنوع ژنتیک پایینی نسبت به گونه‌های دارای غلاف خاردار داشتند. به احتمال زیاد خاردار بودن غلاف به عنوان عامل مهمی برای گسترش گونه‌های یونجه یک‌ساله بوده است. به طوری که غلاف‌های خاردار به راحتی توسط جانوران جابه‌جا شده و این عامل باعث افزایش تنوع آنها نسبت به گونه‌های دارای غلاف صاف شده است. به نظر می‌رسد که اندازه غلاف نیز تأثیر مهمی در پراکنش و میزان تنوع ژنتیکی گونه‌های یک‌ساله یونجه داشته است. زیراکه گونه‌های دارای غلاف‌های درشت از تنوع پایینی نسبت به گونه‌های دارای غلاف‌های ریز برخوردار بودند. در هرصورت برای فهم دقیق عوامل با توجه به نتایج حاصله می‌توان گفت که ریز و خاردار بودن غلاف در گونه‌های یک‌ساله یونجه می‌تواند عامل مهمی در تکامل و سازگاری آنها به عرض‌های مختلف جغرافیایی و شرایط اقلیمی مختلف باشد. بنا و همکاران نحوه تکامل صفت خارداری غلاف را در گونه‌های یونجه یک‌ساله مورد بررسی قرار دادند (۳).

تنوع و تمایز ژنتیک بین گونه‌ای

به منظور بررسی تمایز و تفکیک گونه‌های وحشی یونجه با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره، تجزیه واریانس مولکولی با فرض استقلال گونه‌ها با استفاده از نرم‌افزار Arlequin 2.000 انجام گردید (جدول ۳). نتایج به دست آمده نشان داد که تفاوت معنی‌داری در درون و بین گونه‌های یک‌ساله در سطح احتمال ۵ درصد وجود دارد. تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که ۹۲ درصد تنوع محاسبه شده در گونه‌های وحشی به تنوع

[Downloaded from iutjournals.iut.ac.ir on 2024-05-18]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1385.10.3.28.7]

جدول ۳. تجزیه واریانس مولکولی در گونه‌های یک‌ساله یونجه با استفاده از ۲۵ آلل ریزماهواره

منابع تنوع	درجه آزادی	درصد تنوع	شاخص تثبیت	احتمال[1]
بین گروهی	۱	۳۱/۳۵	۰/۳۱	۰/۰۶۷
بین گونه‌های داخل گروه	۴	۶۱/۶۸	۰/۹۰	<۰/۰۰۰
درون‌گونه‌ای	۲۴	۶/۹۷	۰/۹۳	<۰/۰۰۰

۱. مقدار احتمال با آزمون جایگشت (۱۶۰۰۰ جایگشت تصادفی) محاسبه شده است.

بین‌گونه‌ای و تنها ۸ درصد تنوع به تفاوت بین گیاهان درون گونه‌ها مربوط می‌گردد. تنوع بین‌گونه‌ای بالا به تفاوت مورفولوژیکی زیاد موجود بین گونه‌های وحشی مرتبط می‌گردد زیرا صفات مورفولوژیک اساس طبقه‌بندی و شناسایی گونه‌های یک‌ساله یونجه از یکدیگر بوده است. تنوع درون‌گونه‌ای کم نشان‌دهنده همگنی و شباهت ژنتیک زیاد گیاهان درون گونه‌های وحشی می‌باشد، که ناشی از سیستم آمیزشی خودگشنی می‌باشد.

تمایز و فاصله ژنتیک بین‌گونه‌ها بر اساس شاخص تثبیت (Fst) دوبه‌دوی گونه‌ها مقایسه گردید. تمایز ژنتیک کل بین گونه‌های مورد مطالعه (Fst =۰/۹۳) به مراتب بیشتر از تمایز درون گونه‌ای (Fst = ۰/۰۷) بود. محاسبه فاصله دو به دوی گونه‌ها بر اساس Fst نشان داد که تفاوت معنی‌داری در بین تمام گونه‌ها وجود دارد. این نتایج نشان می‌دهند که جایگاه‌های مورد بررسی از تنوع خیلی زیادی در بین گونه‌های وحشی برخوردار بوده و می‌توانند به همراه نشانگرهای مورفولوژیک ابزار بسیار کارآمدی برای تمایز گونه‌های نزدیک و حتی زیرگونه‌ها باشند.

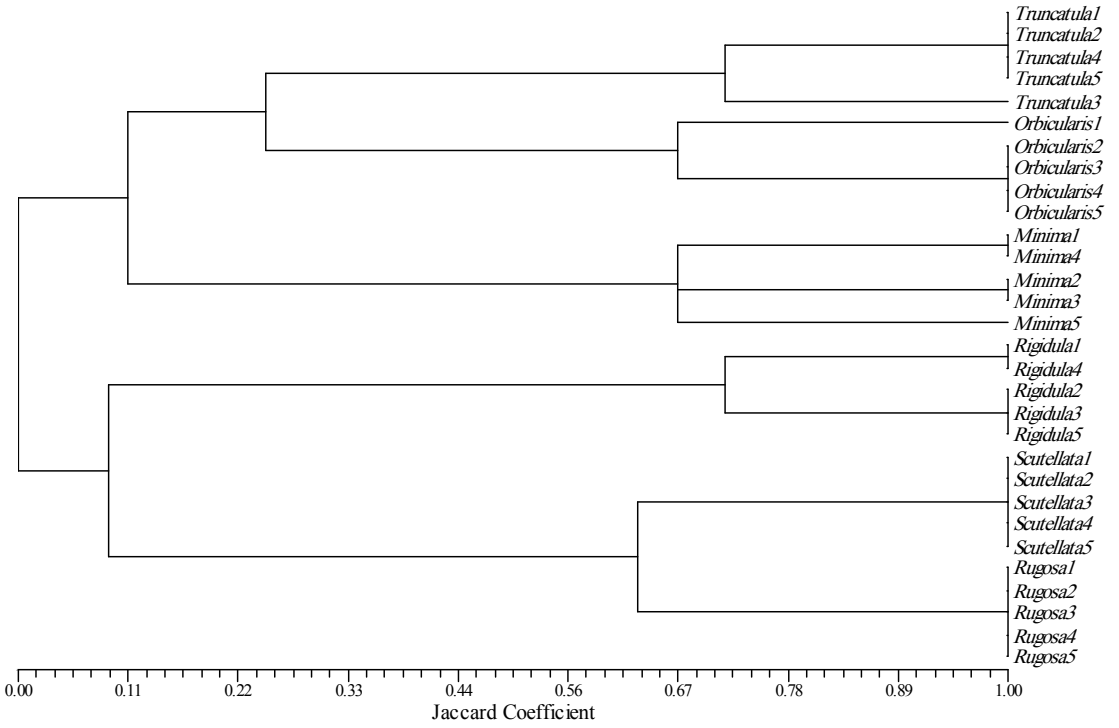
به منظور بررسی تمایز ژنتیکی گونه‌های دیپلوئید از تتراپلوئید با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره تجزیه واریانس مولکولی بین دو گروه دیپلوئید و تتراپلوئید انجام گرفت (جدول ۳). هرچند که مقدار قابل توجهی (در حدود ۲۵ درصد) تنوع مورفولوژیکی بین دو گروه دیپلوئید و تتراپلوئید یونجه‌های یک‌ساله وجود دارد ولی تجزیه واریانس مولکولی از این نظر تفاوت معنی‌داری بین این دو گروه نشان نداد. این شاید به دلیل تعداد کم نشانگرهای مورد استفاده باشد که نشان‌دهنده استفاده از تعداد بیشتر نشانگر جهت تفکیک گونه‌های دیپلوئید و تتراپلوئید در یونجه است.

روابط ژنتیک گونه‌های یک‌ساله یونجه

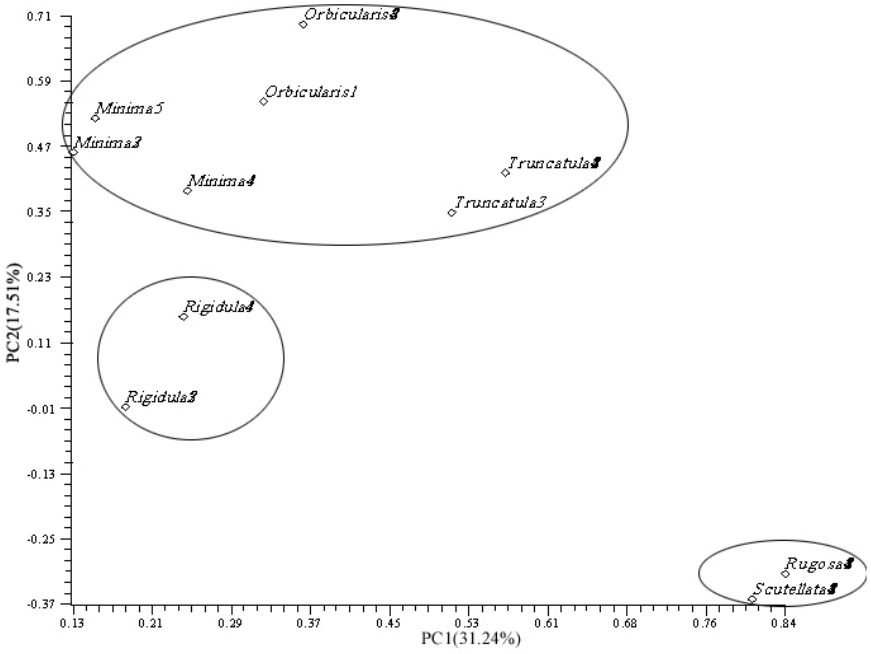
تجزیه خوشه‌ای با ترسیم دندروگرام با استفاده از الگوریتم دورترین همسایه بر اساس ضریب تشابه جاکارد انجام گردید (شکل ۲). میزان شباهت گونه‌های یک‌ساله بر اساس ضریب تشابه جاکارد از صفر تا ۰/۶۲ متغیر بود که نشان‌دهنده تنوع بین گونه‌ای می‌باشد. بر اساس این نتایج، گونه‌های مورد مطالعه به دوگروه تقسیم شدند. گروه اول شامل گونه‌های دیپلوئید (۲n=۲x=۳۲) با تعداد کروموزوم معمولی و گروه دوم شامل ۲ گونه تتراپلوئید (۲n=۲x=۳۰) و گونه دیپلوئید با تعداد کروموزوم ۲n=۲x=۱۴ بود. دو گونه تتراپلوئید بیشترین شباهت ژنتیک (در حدود ۶۲ درصد) را در بین گونه‌های مورد مطالعه داشتند. بنابراین گونه‌های با تعداد کروموزوم غیر معمولی روابط خویشاوندی و تکاملی نزدیکی نسبت به بقیه گونه‌ها با هم دارند. مطالعات مختلف مبنی بر تکامل گونه‌های دیپلوئید و تتراپلوئید یونجه‌های یک‌ساله نشان داده‌اند که این دو گونه احتمالاً از دورگ‌گیری گونه‌هایی با تعداد کرموزوم ۲n=۲x=۱۶ و ۲n=۲x=۱۴ و مضاعف شدن کروموزوم‌های هیبرید حاصله تکامل یافته‌اند. بر اساس نتایج به دست آمده از تجزیه خوشه‌ای رابطه نزدیک بین دو گونه تتراپلوئید *M. rugosa* و

[Downloaded from iutjournals.iut.ac.ir on 2024-05-18]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1385.10.3.28.7]



شکل ۲. گروه‌بندی گونه‌های یونجه یکساله با استفاده از الگوریتم دورترین همسایه



شکل۳. پراکنش دوبعدی حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی در گونه‌های یونجه یک‌ساله(با توجیه ۴۹ درصد از تنوع کل). PC1 و PC2 به ترتیب مؤلفه اصلی اول و دوم می‌باشد.

[Downloaded from iutjournals.iut.ac.ir on 2024-05-18]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1385.10.3.28.7]

M. scutellata فرضیه وجود اجداد مشترک برای این دو گونه قوت می‌بخشد. پژوهش‌های انجام شده توسط سایر محققان نیز خویشاوندی نزدیک این دو گونه تتراپلوئید را اثبات کرده‌اند (۳، ۶، ۱۱ و ۲۰).

پراکنش دوبعدی گونه‌های یونجه یک‌ساله حاصل بر اساس تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نیز تصویر واضحی از روابط بین آنها را نشان می‌دهد (شکل ۳). نتایج این تجزیه نشان می‌دهد که دو گونه *M. scutellata* و *M. rugosa* فاصله ژنتیک زیادتری از سایر گونه‌ها دارند. این دو گونه تنها گونه‌های تتراپلوئید (۲n=۴x=۳۰) یونجه یک‌ساله هستند که در اکثر گزارش‌ها نیز خویشاوندی نزدیک بین آنها ثابت شده است. با توجه به نتایج این پژوهش و یافته‌های سایر پژوهشگران این دو گونه به علت رابطه خویشاوندی نزدیک از اجداد مشترکی منشا گرفته‌اند که با گذشت زمان دو گونه امروزی حاصل شده‌اند.

سپاسگزاری

از کارکنان و همکاران پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی که در انجام این طرح همکاری داشتند تشکر می‌شود. هم‌چنین از جناب آقای دکتر نادری شهاب به‌خاطر فراهم نمودن مقداری از مواد ژنتیک گیاهی، تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع مورد استفاده

1. Baquerizo-Audiot, E., B. Desplanque, J. M. Prosperi and S. Santoni. 2001. Characterization of microsatellite loci in the diploid legume *Medicago truncatula* (barrel Medic). Mol. Ecol. Notes 1: 1-3.
2. Bassam, B., J. G. Caetano-Anolles and P. M. Gressho. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 19: 680-683.
3. Bena, G., J. M. Prosperi, B. Lejeune and I. Olivieri. 1998a. Evolution of annual species of the genus *Medicago*: A molecular phylogenetic approach. Mol. Phyl. Evol. 9: 552-559.
4. Bena, G., B. Lejeune, J. M. Prosperi and I. Olivieri. 1998b. Molecular phylogenetic approach for studying life-history evolution: the ambiguous example of the genus *Medicago* L. Proc. R. Soc. Lond. B. 265: 1141-1151.
5. Bena, G., J. M. Prosperi, I. Olivieri and B. Lejeune, 1998c. Ribosomal external and internal transcribed spacers: combined use in the phylogenetic analysis of *Medicago* (Legominasae). J. Mol. Evol. 46:229-306.
6. Bena, G. 2001. Molecular phylogeny supports the morphologically based taxonomic transfer of the "medicagoid" Trigonella species to the genus *Medicago* L. Plant Sys. Evol. 217-236.
7. Bonnin, I., T. Huguet, M. Gherardi, J. M. Prosperi and I. Olivieri. 1996a. High level of polymorphism and spatial structure in a selfing plant species (*Medicago truncatula*, Legominoseae) shown using RAPD markers. Amer. J. Bot. 83: 843-855.
8. Bonnin, I., J. M. Prosperi and I. Olivieri. 1996b. Genetic markers and quantitative genetic variation in *Medicago truncatula* (Leguminosae): a comparative analysis of population structure. Genetics 143: 1795-1805.
9. Bonnin, I. and J. Ronfort. 2001. Spatial effect and rare outcrossing events in *M. truncatula* (Fabaceae). Mol. Ecol. 10: 1372-1383.
10. Brummer, E. C., G. Kochert and J. H. Bouton. 1991. RFLP variation in diploid and tetraploid alfalfa. Theor. Appl. Genet. 83:89-96.
11. Brummer, E. C., J. H. Bouton and G. Kochert. 1995. Analysis of annual *Medicago* species using RAPD markers. Genome 38: 362-367.
12. Caluum, J. B., R. A. Dixon, A. D. Farmer, R. Flores, J. Inman, R. A. Gonzales, M. J. Harrison, N. L. Paiva, A. D. Scott, J. W. Weller and G. D. May. 2001. The *Medicago* Genome Initative: a model legume database. Nucleic Acids Res. 29(1): 114-117.
13. Dellaporta, S. L., J. Wood and J. B. Hicks. 1983. A plant DNA minipreparation: Version II. Plant Mol. Bio. Rep. 1:19-21.
14. 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.
15. Diwan, N., J. H. Bouton, G. Kochert and P. B. Cregan. 2000. Mapping simple sequence repeats (SSR) DNA markers in diploid and tetraploid alfalfa. Theor. Appl. Genet. 101:165-172.
16. Echt, C. S., L. A. Erdahl, and T. J. McCoy. 1991. Genetic segregation of random amplified polymorphic DNA in

[Downloaded from iutjournals.iut.ac.ir on 2024-05-18]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1385.10.3.28.7]

diploid cultivated alfalfa. Genome 35: 84-87.
17. Echt, C. S., K. K. Kidwell, S. J. Knapp, T. C. Osborn and M. J. McCoy. 1993. Linkage mapping in diploid alfalfa (*Medicago sativa*). Genome. 37:61-71.
18. Excoffier, L., P. E. Smouse and M. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics 131: 479-491.
19. Kalo, P., G. Endre, L. Zimanyi, G. C. Sandi and G. B. Kiss. 2000. Construction of an improved linkage map of diploid alfalfa (*M. sativa*). Theor. Appl. Genet. 100: 641-657.
20. Mariani A., F. Pupilli and O. Calderini. 1996. Cytological and molecular analysis of annual species of the genus *Medicago*. Can. J. Bot. 74: 299-307.
21. 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.
22. Rohlf, F. J. 1998. NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 2.02. Exeter Software, New York.
23. Schneider, S., J. M. Kueffer, D. Roessli and L. Excoffier. 2000. ARLEQUIN: A Software for Population Genetics Data Analysis, Version 2.0, University of Geneva, Geneva.
24. Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequence as a general source for polymorphic DNA markers. Nucleic Acids Res. 7:6463-6470.
25. Vitale M., F. Pupilli, P. Labombarda and S. Arcioni. 1998. RAPD analysis reveals a low rate of outcrossing in burr medic (*M. polymorph* L.). Genet. Res. Crop Evol. 43: 337-342.

[Downloaded from iutjournals.iut.ac.ir on 2024-05-18]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1385.10.3.28.7]