

بررسی تنوع ژنتیکی و روابط خویشاوندی یونجه‌های یکساله دیپلولئید و تراپلولئید با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره

محسن فلاحتی عنبران^۱، علی‌اکبر حبشهی^۲، مسعود اصفهانی^۳، 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، ثبیت 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 دیپلولئید (*M. minima* و *M. orbicularis* *M. rigidula* *M. truncatula*) و دو گونه یکساله تراپلولئید (*M. rugosa* Desr.) و *M. scutellata* Mill. (مورد بررسی قرار گرفت). دی‌ان‌آی تنومی استخراج شده از نمونه‌های گیاهی با ۶ جفت آغازگر ریزماهواره تحت واکنش زنجیره‌ای پلیمراز قرار گرفته و محصولات آنها روی ژل پلی‌اکریل آمید و اسرشته‌ساز الکتروفورز شدند. نتایج به دست آمده نشان داد واکنش زنجیره‌ای پلیمراز قرار گرفته و محصولات آنها روی ژل پلی‌اکریل آمید و اسرشته‌ساز 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. scutellata* Mill. تا ۱۱۴ در گونه *M. minima* و *M. rugosa* 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 بین گونه‌ای در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار و میزان تنوع بین گونه‌ای 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 خوشای با استفاده از روش دورترین همسایه و تجزیه به مؤلفه‌های اصلی دو گونه تراپلولئید *M. scutellata* Mill. و *M. rugosa* را در یک گروه قرار داد که نشان دهنده 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 مرتب 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

مقدمه

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) 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 بروم 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 نشانگرهای هم‌چنین برای بررسی میزان دگرگشتنی و تنوع در یونجه‌های یکساله از جمله *M. polymorpha* (۲۵) و *M. truncatula* (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 چندآلی هستند که در زنوم موجودات به طور فراوان وجود دارند. به علت ماهیت تنوع بالای توالی‌های ریزماهواره‌ای در زنوم، 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 ۱-۶ جفت بازی هستند که پشت سر هم تکرار شده (۲۴) و به علت جهش زیاد از تنوع قابل ملاحظه‌ای حتی در بین افراد یک جمعیت برخوردار می‌باشند.

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 تثیت بیولوژیک ازت بوده و برای جلوگیری از فرسایش خاک نیز مفیدند. در بیشتر کشورها از این گیاهان برای تولید کود سبز و علوفه (به عنوان 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. rugosa Desr.* و *M. scutellata Mill.* 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 به عنوان 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 تترابلولئید ($2n=32$) بوده ولی تعدادی از آنها دیپلولئید ($2n=4x=4x=32$) نیز می‌باشند و تنها دو گونه *M. saxatillis* و *M. B. B.* هگزاپلولئید ($2n=6x=48$) هستند. گونه‌های یکساله دارای $2n=2x=16$ بوده به استثنای اینکه *M. praecox DC.* *M. murex Willd.* چهار گونه *M. rigidula Desr.* و *M. polymorpha L.* هستند و تنها *M. rugosa Desr.* و *M. scutellata Mill.* گونه‌های یکساله تترابلولئید با $2n=4x=30$ می‌باشند (۱۴). استفاده مؤثر از منابع ژنتیک و ذخایر تواریشی 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

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

گونه	سطح پلوئیدی	منشا	میانگین تنوع ژنتیک
<i>M. truncatula</i>	$2n=2x = 16$	کازرون	۰/۰۶۷
<i>M. orbicularis</i>	$2n=2x = 16$	کرمانشاه	۰/۰۶۷
<i>M. minima</i>	$2n=2x = 16$	کرمانشاه	۰/۱۳
<i>M. rigidula</i>	$2n=2x = 14$	اردبیل	۰/۱۰
<i>M. rugosa</i>	$2n=4x = 30$	خراسان	۰/۰۰
<i>M. scutellata</i>	$2n=4x = 30$	گرگان	۰/۰۰
میانگین			۰/۰۶

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 دیپلوفید با تترابلوئید 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 پتروی 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 -80°C منتقل شدند. استخراج دی‌ان‌آ بر اساس روش

نیسانگرهای 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 نیسانگرهای 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 یونین و همکاران (۲۰۰۱) تعدادی از این جایگاه‌ها را برای بررسی ساختار فاصله‌ای و تنوع ژنتیک داخل جمعیتی در گونه *M. truncatula* استفاده کردند (۹). نیسانگرهای ریزماهواره ابزار مناسبی برای تمایز ارقام و اکوتیپ‌های زراعی می‌باشند. یکی از ویژگی‌های بارز این نیسانگرهای تفکیک گیاهان هتروزیگوت از هموزیگوت است.

تخمین میزان تنوع ژنتیکی به عنوان یکی از گام‌های پایه‌ای و اساسی در نگهداری و حفاظت مواد ژنتیک در بانک بذر و اجرای برنامه‌های به نزدیکی 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

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

جایگاه	آلل‌ها	تعداد کل	دامنه اندازه آلل	میانگین تعداد آلل در هر گیاه	درصد تنوع درون گونه‌ای	شاخص تثیت ^۱ (Fst)
						بین گونه‌ای
AFct32	۳	۱۰۵-۱۱۳	۱	۰	۱۰۰	۱
AFca11	۳	۱۳۰-۱۵۱	۱	۱۵	۸۵	۰/۸۴
AFca16	۷	۸۹-۱۰۷	۱/۳۳	۰	۱۰۰	۱
AFctl1	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 در حالی که در گونه‌های دیگر دارای ۱ آلل با طول متفاوت برای هر گونه بود.

انجام گردید و بسط نهایی در ۷۲ °C 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 و اسربشته‌ساز استاندارد ۶ درصد (در دستگاه GT Bio Rad Squi-Gen) بارگذاری و با توان ثابت ۹۰ وات به مدت ۳۰-۴۵ 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 درون گونه‌ای 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 به کار برده شد (۱۸). فاصله دو به دوی گونه‌ها بر اساس

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

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

شش نشانگر ریزماهواره معرفی شده 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 میلی مولار کلرید پتاسیم، ۱۰ میلی مولار تریس-اسید کلریدریک و ۰/۰۱٪ ژلاتین)، ۲۰ میلی مولار کلرور منیزیم، ۱/۵ واحد تک دی‌ان‌آ پلیمراز، ۲۰ پیکو مول از هر آغازگر، ۰/۲ میلی مولار 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 و اسربشته‌سازی اولیه در ۹۴ °C، 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 ۹۴ °C (جهت و اسربشته‌سازی)، ۳۰ ثانیه در ۵۲ °C (جهت اتصال آغازگرهای) و ۳۰ ثانیه در ۷۲ °C (جهت بسط)

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 صورتی که 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 تنها یی تمام گونه‌ها را از هم متمايز 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 خودگشн بوده و از سطح پلوئیدی پایینی نسبت به گونه‌های تترابلوفید برخوردارند، به طوری که خودگشنسی 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 و AFca32 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

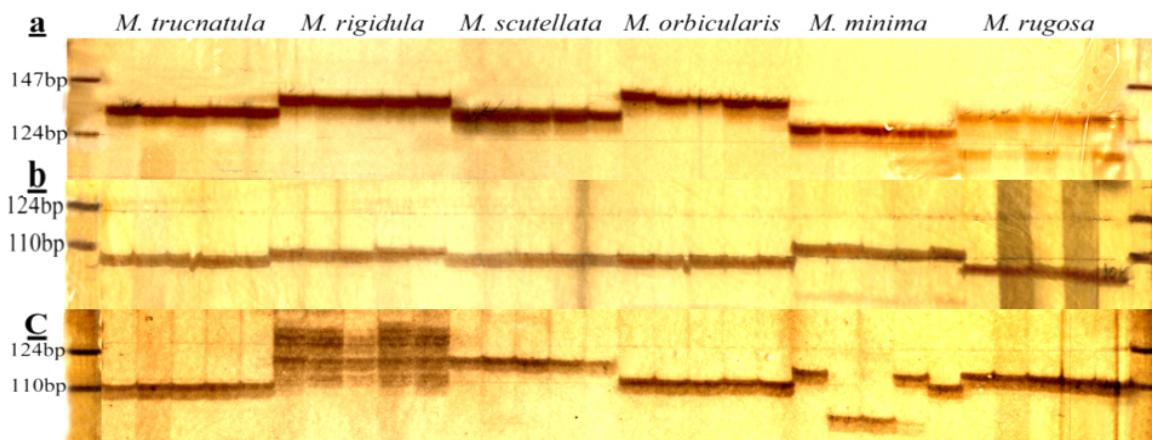
در جدول ۱ برآورد میانگین تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای نشان داده شده است. گونه *M. minima* با میانگین ۰/۱۳ بیشترین تنوع را در بین گونه‌های مورد بررسی داشت و دو گونه تترابلوفید *M. rugosa* و *M. scutellata* فاقد تنوع بودند. دو

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 NTSYS-pc 2.02 اساس ضریب تشابه جاکارد، با نرم افزار (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 به کاررفته 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) 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 تترابلوفید *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 ۱۹۱-۱۹۳ جفت باز) تفاوت داشتند. برای این جایگاه در گونه‌های *M. rigidula* و *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



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

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. زیرا گونه‌های دارای غلاف‌های درشت از تنوع پایینی نسبت به گونه‌های دارای غلاف‌های ریز برخوردار بودند. در هر صورت 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 Arlequin 2.000 نرم‌افزار 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

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

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

مقایسه میزان تنوع ژنتیک با تعییرات 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 جانواران جایه‌جا شده و این عامل باعث افزایش

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

منابع تنوع	درجه آزادی	درصد تنوع	شاخص ثبیت	احتمال ^۱
بین گروهی	۱	۳۱/۳۵	۰/۳۱	۰/۰۶۷
بین گونه‌های داخل گروه	۴	۶۱/۶۸	۰/۹۰	<۰/۰۰۰
درون گونه‌ای	۲۴	۶/۹۷	۰/۹۳	<۰/۰۰۰

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

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 دیپلولئید و تترابلولئید در یونجه است.

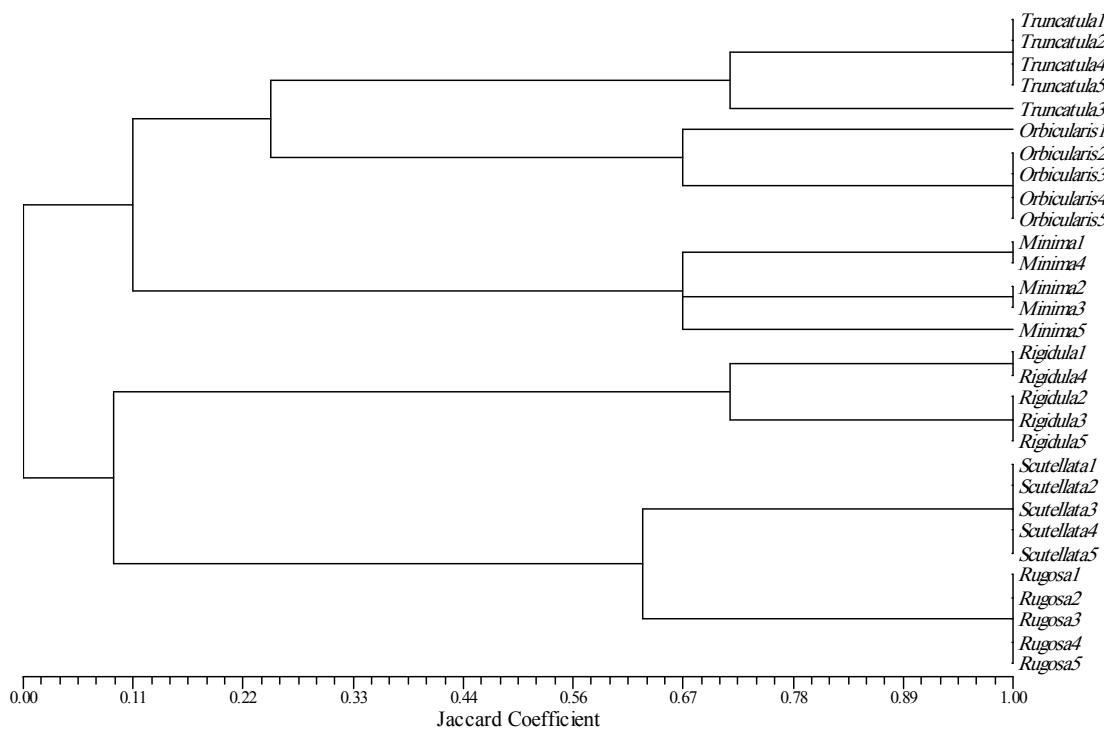
روابط ژنتیک گونه‌های یکساله یونجه

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 دو گروه تقسیم شدند. گروه اول شامل گونه‌های دیپلولئید ($2n=2x=32$) با تعداد کروموزوم معمولی و گروه دوم شامل ۲ گونه تترابلولئید ($2n=2x=30$) و گونه دیپلولئید با تعداد کروموزوم $2n=2x=14$ بود. دو گونه تترابلولئید 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 دیپلولئید و تترابلولئید یونجه‌های یکساله نشان داده‌اند که این دو گونه احتمالاً از دورگ‌گیری گونه‌هایی با تعداد کرموزوم $2n=2x=16$ و $2n=2x=14$ و مضاعف شدن کروموزوم‌های هیبرید حاصله تکامل یافته‌اند. بر اساس نتایج به دست آمده از تجزیه خوشهای رابطه نزدیک بین دو گونه تترابلولئید *M. rugosa* و

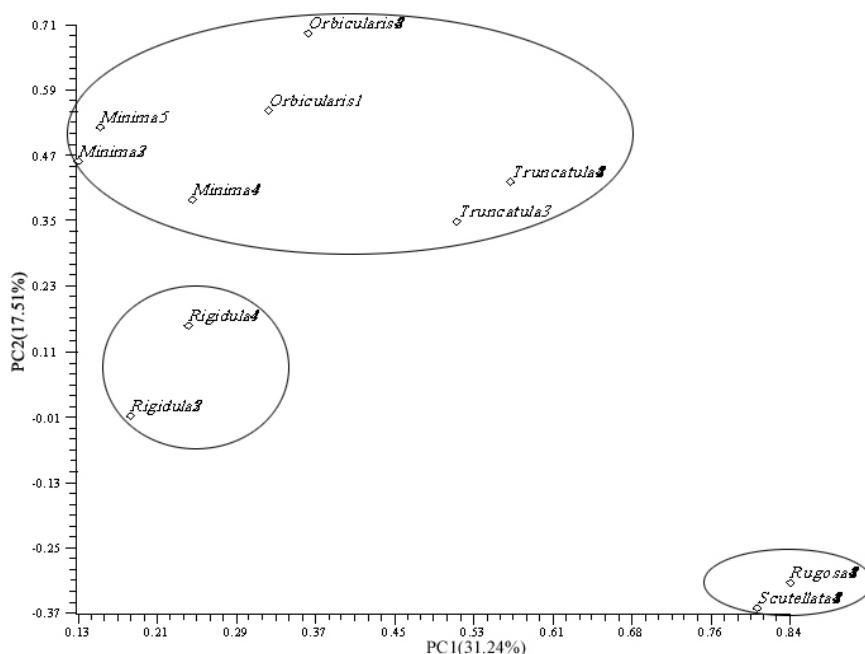
بین گونه‌ای و تنها ۸ درصد تنوع به تفاوت بین گیاهان درون گونه‌ها مربوط می‌گردد. تنوع بین گونه‌ای بالا به تفاوت مورفو‌لوزیکی زیاد موجود بین گونه‌های وحشی مرتبط می‌گردد زیرا صفات مورفو‌لوزیک اساس طبقه‌بندی و شناسایی گونه‌های یکساله یونجه از یکدیگر بوده است. تنوع درون گونه‌ای کم نشان‌دهنده همگنی و شباهت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

تمایز و فاصله ژنتیک بین گونه‌ها بر اساس شاخص ثبیت (Fst) (دوی گونه‌ها مقایسه گردید. تمایز ژنتیک کل بین گونه‌های مورد مطالعه ($Fst = 0/۹۳$) به مرتبه بیشتر از تمایز درون گونه‌ای ($Fst = 0/۰۷$) 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 مورفو‌لوزیک ابزار بسیار کارآمدی برای تمایز گونه‌های نزدیک و حتی زیر گونه‌ها باشند.

به منظور بررسی تمایز ژنتیکی گونه‌های دیپلولئید از تترابلولئید با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره تجزیه واریانس مولکولی بین دو گروه دیپلولئید و تترابلولئید انجام گرفت (جدول ۳). هرچند که مقدار قابل توجهی (در حدود ۲۵ درصد) تنوع مورفو‌لوزیکی بین دو گروه دیپلولئید و تترابلولئید یونجه‌های یکساله وجود دارد ولی تجزیه واریانس مولکولی از



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



شکل ۳. پرائشن دوبعدی حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی در گونه‌های یونجه یکساله (با توجه به ۴۹ درصد از تنوع کل). PC1 و PC2 به ترتیب مؤلفه اصلی اول و دوم می‌باشد.

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. همچنانی از جناب آقای دکتر نادری شهاب به خاطر فراهم نمودن مقداری از مواد ژنتیک گیاهی، تشکر و قدردانی می‌گردد.

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

پراکنش دو بعدی 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. rugosa* و *M. scutellata* فاصله ژنتیک زیادتری از سایر گونه‌ها دارند. این دو گونه تنها گونه‌های تترابلولئید ($2n=4x=30$) یونجه یکساله هستند که در اکثر گزارش‌ها نیز خویشاوندی نزدیک بین آنها ثابت شده است. با توجه به نتایج

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* (Leguminosae). 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*, Leguminosae) 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 Initiative: 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

- 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.