

تجزیه تنوع ژنتیکی و سیتوژنتیکی نژادگان‌های مختلف یونجه (*Medicago sativa* L.) در ایران

محسن فرشادفر^{۱*}، فاطمه بلورچیان^۲، هوشمند صفری^۳ و هومن شیروانی^۴

۱ و ۴. دانشیار و مدرس، گروه کشاورزی، دانشگاه پیام‌نور

۲. کارشناس ارشد باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

۳. استادیار، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرمانشاه

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۴/۲ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۹/۱۳)

چکیده

یونجه یکی از گیاهان علوفه‌ای است که به علت میزان پروتئین بالا، خوش‌خوراکی، قابلیت هضم بالا و سازگاری آن در شرایط مختلف محیطی اهمیت بالایی دارد. در این تحقیق تنوع ژنتیکی نوزده نژادگان (ژنوتیپ) از گونه *Medicago sativa* با استفاده از نشانگرهای سیتوژنتیکی و مولکولی بررسی شد. بر پایه داده‌های سیتوژنتیکی تنوع معنی‌داری برای صفات کاربوتیپی وجود داشت. نژادگان‌های ES-211 (اصفهان ۱)، ES-027 (شاهرود)، ES-199 (کدی ۱)، ES-065 (زردشت)، ES-037 (اصفهان ۲) بیشترین میزان کروماتین و بیشترین نبود تقارن را داشتند و کاربوتیپ متکاملی داشتند. بیشترین شاخص بدون تقارن (AI) را نژادگان‌های ES-211 (اصفهان ۱) و ES-119 (کدی ۱) و کمترین میزان را نژادگان ES-037 (اصفهان ۲) داشت. همچنین بیشترین میزان تغییرات نسبی طول کروموزوم (CV_{CL})، میانگین بدون تقارن سانترومیری (M_{CA})، انحراف معیار نسبت بازوها (r-value) و طول نسبی کروموزوم (RL%) مربوط به نژادگان ES-119 (کدی ۱) و کمترین میزان متعلق به نژادگان ES-058 (کدی ۲) بود. بررسی الگوی نواری (باندی) هشت آغازگر (پرایمر) ISSR شمار ۲۹ نوار چندشکلی (پلی‌مورف) را مشخص کرد. پس از امتیازدهی نوارهای چندشکلی میانگین شاخص محتوای داده‌های چندشکلی (PIC) در هر آغازگر برابر ۰/۳۲ محاسبه شد. کمترین میزان درصد چندشکلی را آغازگرهای IS_{۱۴} (۵۰٪) و IS_{۱۵} (۵۰٪) و IS_{۱۴} (۵۷/۱۴٪) داشتند و درصد چندشکلی برای دیگر آغازگرها ۱۰۰ درصد است، همچنین میانگین درصد چندشکلی برابر ۸۶ درصد بود. شمار نوارهای چندشکلی برای آغازگرها از سه تا شش نوار متغیر بود. میانگین شمار نوار در هر آغازگر برابر ۴/۶۲ تعیین شد. تجزیه خوشه‌ای داده‌های مولکولی و سیتوژنتیکی ۱۹ نژادگان را در سه گروه قرار داد.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، کاربوتیپ، یونجه (*Medicago sativa* L.)، ISSR.

Analysis of genetic and cytogenetic variations between alfalfa (*Medicago sativa* L.) genotypes in Iran

Mohsen Farshadfar^{1*}, Fatemeh Boloorchian², Hooshmand Safari³ and Hooman Shirvani⁴

1, 4. Associate Professor and Teacher, Department of Agriculture, Payame Noor University, Iran

2. Former M. Sc. Student, Young Researchers Club, Islamic Azad University, Kermanshah Branch, Kermanshah, Iran

3. Assistant Professor, Research Center of Agriculture & Natural Resources, Organization of Research, Agricultural Education, Kermanshah, Iran

(Received: Jun. 22, 2016 - Accepted: Dec. 3, 2016)

ABSTRACT

Alfalfa (*Medicago sativa* L.) is one of the important forage crops producing highly nutritious biomass and adaptability. In this study the genetic diversity among 19 genotypes of *Medicago sativa* was evaluated based on the molecular and cytogenetic markers. Molecular studies were carried out based on eight Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) primers. Cytogenetic data were obtained by karyotype analysis with mitotic chromosomes. There were significant differences between cytogenetic characteristics ($P \leq 0.01$). The genotypes ES-211, ES-027, ES-037, ES-065, and ES-199 had the greatest chromatin content and the highest asymmetrical value as well. The greatest amount of asymmetry index (AI) belonged to ES211, E119 while the least value of AI was ES037. The genotype ES119 had the greatest CV_{CL}, Mean centromeric asymmetry (M_{CA}), r-value and relative length (RL%) characteristics. Analysis of banding patterns of eight ISSR primers revealed 29 polymorphic bands. A total of 29 polymorphic fragments were scored and the average of polymorphic information content (PIC) was 0.32. The number of polymorphic fragments for each primer varied from three to six with mean of 4.62 polymorphic fragments per primer. The mean polymorphic percentage was 86%. The Cluster analysis of molecular data classified all 19 genotypes into three different groups. According to the karyotypic characteristics, all genotypes were grouped to three clusters as well.

Keywords: Genetic diversity, karyotype, ISSR, *Medicago sativa* L..

* Corresponding author E-mail: Farshadfarmohsen@Yahoo.com

مقدمه

یونجه (*Medicago sativa* L.) به‌عنوان یک گیاه چندساله از خانواده بقولات، مهم‌ترین گیاه علوفه‌ای برای تغذیه دام بوده که پس از غلات، مهم‌ترین محصول اقتصادی در جهان به‌شمار می‌آید (Barcaccia *et al.*, 1999; Diwan *et al.*, 1997). آگاهی از میزان تنوع ژنتیکی ذخایر توارثی (ژرم پلاسما) گونه‌های گیاهی در اصلاح نباتات اهمیت خاصی دارد. این موضوع به‌ویژه در مورد یونجه برای تولید رقم‌های ساختگی مهم است زیرا که تولید رقم‌های ساختگی مبتنی بر انتخاب والدین متنوع و عملکرد مطلوب می‌باشد تا در نتیجه آن، بیشترین دورگ برتری (هتروزیس) در نتاج به دست آید (Brummer, 1999). از سوی دیگر اطلاع از میزان چندشکلی یا تفاوت بین نمونه‌های مختلف، به‌منظور کاهش حجم نمونه‌های ذخایر توارثی نگهداری‌شده در بانک ژن و بررسی خلوص بذر به‌ویژه در گیاه دگرگشنی مانند یونجه بسیار سودمند خواهد بود. بررسی تنوع ژنتیکی نه تنها برای سازمان‌دهی و حفاظت مواد گیاهی، بلکه برای پدیده دورگ برتری و تولید بذرهای دورگ (هیبرید) نیز اهمیت دارد (Liliya, 2000). بررسی تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت‌های یونجه زراعی می‌تواند خطرهای احتمالی ناشی از فرسایش ژنتیکی را ارزیابی کرده و به توسعه حفاظت مؤثر از منابع ژنتیکی در طراحی راهبرد بهبود ژنتیک این گیاه کمک کند (Peng *et al.*, 2007). در تحقیقات به‌نژادی انجام بررسی‌های سیتوژنتیکی از اقدام‌های اولیه است زیرا که شناخت شمار کروموزوم‌ها در انتخاب روش‌های به‌نژادی مؤثر است و تعیین سطح پلوئیدی نیز که از بررسی‌های کروموزومی به دست می‌آید در انجام دورگ‌گیری اهمیت فراوانی دارد (Hieter and Griffiths, 1999). نشانگرهای مولکولی با انواع پرشمار و برتری‌های بسیار به‌عنوان یک ابزار تکمیلی، همراه نشانگرهای ریخت‌شناختی و فیزیولوژیکی در بررسی رابطه‌های تبارزایی (فیلوژنتیکی) گیاهی استفاده می‌شوند، زیرا تحت تأثیر شرایط محیطی نبوده و در هر مرحله از رشد گیاه قابل استفاده هستند (Manifesto *et al.*, 2001). توالی‌های بین ریز ماهواره (ISSR) نشانگرهای مولکولی نیمه تصادفی هستند (Brantestam *et al.*, 2004). افزونش در این نشانگر در

حضور یک آغازگر مکمل با توالی‌های ریز ماهواره (SSR) هدف انجام می‌پذیرد (Surve-Iyer *et al.*, 1995). از این نشانگر به‌منظور افزونش قطعه‌ای از DNA بین دو ریز ماهواره که در نژادگان (ژنوتیپ) یک گونه در حالت عکس یکدیگر قرار گرفته‌اند، استفاده می‌شود. متداول بودن کشت و کار رقم‌ها و بوم‌جور (اکوتیپ)‌های یونجه و همچنین توانایی خوب این گیاه در سازگاری با شرایط جدید، موجب افزایش تنوع و مشکل‌تر شدن شناسایی توده‌های آن شده است. بیشتر داده‌های موجود به‌طور عمده در زمینه مقایسه ویژگی‌های کمی و کیفی رقم‌ها است. این داده‌ها برای شناسایی و طبقه‌بندی توده‌های بومی کافی نبوده و بررسی‌های دقیق‌تر، جامع‌تر و منسجم‌تری برای شناسایی و طبقه‌بندی توده‌های محلی کشور ایجاب می‌کند (Veronesi *et al.*, 2010). با توجه به دگرگشنی و تتراپلوئید بودن یونجه (Ronfort, 1998) انتظار می‌رود که تنوع ژنتیکی زیادی درون جمعیت‌های یونجه وجود داشته باشد. به‌رغم بومی بودن این گیاه، از میزان تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های یونجه ایران داده‌های چندانی در دست نیست. در این تحقیق از نشانگرهای سیتوژنتیکی و مولکولی برای بررسی سودمندی و کارایی این نشانگرها در ارزیابی تنوع بین نژادگان‌های یونجه و همچنین در تمایز ژنتیکی نژادگان‌ها استفاده شده است.

مواد و روش‌ها

در تحقیق انجام‌شده نوزده نژادگان یونجه (*Medicago sativa*) تهیه‌شده از بانک ژن منابع طبیعی ایران (جدول ۱) در آزمایشگاه سیتوژنتیک و بیوتکنولوژی دانشگاه پیام‌نور مرکز کرمانشاه ارزیابی شدند.

جدول ۱. کد بانک ژن و منشأ نژادگان‌های یونجه مورد

بررسی

Table 1. Gene bank code and origin of alfalfa genotypes

Number	Origin	Gen bank code	Number	Origin	Gen bank code
1	Esfahan1	ES-211	11	Flavorjan	Es-083
2	Sharood	ES-027	12	Kodi2	Es-058
3	Esfahan2	Es-037	13	Kerman	Es-036
4	Kodi1	Es-199	14	Zardasht	Es-065
5	Yazd	Es-024	15	Sirjan	Es-006
6	Keristari	Es-054	16	Gorgan	Es-050
7	FAO	KR-3003	17	Esfahan3	Es-126
8	Torbati	Es-032	18	Mashad	Es-031
9	Tehran	Es-011	19	Unknown	G-19
10	Birjand	Es-034			

آزمایش سیتوزنتیکی

درون کروموزومی^۷ (AI)، شاخص نامتقارن بودن بین کروموزومی^۸ (A2)، اختلاف طول نسبی کروموزوم^۹ (DRL) (Romero-Zarco, 1986)، شاخص نبود تقارن^{۱۰} (AI) (Arano and Saito 1980)، تغییر نسبی طول کروموزوم^{۱۱} (CV_{CL}) (Paszko, 2006)، میانگین نبود تقارن سانترومری^{۱۲} (M_{CA}) (Watanabe *et al.*, 1999)، طول نسبی کروموزوم^{۱۳} (RL%) و انحراف معیار نسبت بازوها (r-value) محاسبه و در محیط Excel ذخیره شدند، همچنین نوع کروموزومها (KF) بر پایه روش Levan تعیین شد (Levan *et al.*, 1964). در پایان تجزیه‌های آماری توسط نرم‌افزارهای SPSS و MSTATC صورت گرفت.

آزمایش مولکولی

استخراج DNA به روش CTAB تغییر یافته (Doyle and Doyle, 1987) برای نژادگانها انجام گرفت. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از ژل آگارز ۰/۸ درصد (وزنی / حجمی) و روش طیف‌سنجی نوری (اسپکتروفتومتری) مشخص شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) در حجم ۲۰ میکرولیتر (۵۰ نانوگرم DNA الگو، ۲ میلی‌مولار MgCl₂، ۰/۵ میلی‌مولار از هر dNTP، ۰/۲ میکرومول آغازگر، یک واحد آنزیم Taq DNA Polymerase و بافر واکنش به میزان ۱x) انجام شد. چرخه دمایی شامل یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس و به مدت ۵ دقیقه و ۴۰ چرخه دمایی بود که در هر چرخه نیز، زمان و دمای واسرشت‌سازی به ترتیب ۳۰ ثانیه و ۹۵ درجه سلسیوس، زمان اتصال آغازگر ۴۵ ثانیه و دمای آن برای هر آغازگر متفاوت بود. همچنین زمان و دمای توسعه رشته نیز به ترتیب ۶۰ ثانیه و ۷۲ درجه سلسیوس بود. توسعه نهایی به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس انجام شد. در این آزمایش از ژل آگارز ۲ درصد (وزنی / حجمی) با بافر TBE ۱

در آغاز بذرها درون پتری‌دیش و روی کاغذ صافی کشت شدند. پس از ۴۸ ساعت ریشه آن‌ها به اندازه مناسب برای نمونه‌گیری رسید و در فاصله‌های زمانی ۱۰ تا ۱۱ صبح بیشترین شمار یاخته‌های متافازی مشاهده شد. در این زمان پیش تیمار با محلول آلفا برومونفتالین ۰/۱ درصد (وزنی / حجمی) به مدت ۳ ساعت انجام گرفت. پس از این مرحله ریشه‌ها برای عمل تثبیت مدت ۱۸ ساعت در محلول لویتسکی قرار گرفتند. پس از تثبیت برای نگهداری طولانی بی‌درنگ در اتانول ۷۰ درصد (حجمی / حجمی) به یخچال منتقل شدند. برای بررسی نژادگان‌های نمونه‌ها در ماده آبکافت (هیدرولیز)کننده (NaOH ۱ نرمال) در دمای ۶۴ درجه سلسیوس قرار داده شدند. پس از آبکافت، نمونه‌ها در محلول رنگ همتوکسیلین به مدت ۴ ساعت قرار گرفتند. پس از قرار دادن نمونه‌ها روی لام، منطقه مرستمی با استفاده از تیغ مخصوص برش داده شد و یک قطره محلول استیک اسید ۴۵ درصد (حجمی / حجمی) روی نمونه ریخته و لامل روی آن گذاشته شد، با وارد کردن ضربه‌های آهسته روی نمونه یاخته‌های ریشه پخش شدند. تصاویر کروموزومی از روش Color Video Camera که روی میکروسکوپ نوری مدل الیمپوس BH2 نصب شده بود ذخیره شدند. کروموزوم‌های ۵ یاخته متافازی عکس‌برداری شده از هر نژادگان در یک فایل جداگانه مرتب شد. با استفاده از نرم‌افزار MicroMeasure 3.3 و از راه مشخص کردن ابتدا و انتهای کروموزوم و محل سانترومر آن‌ها، ویژگی‌های کروموزومی مانند طول بازوی بلند^۱ (L)، طول بازوی کوتاه^۲ (S)، طول کل کروموزوم^۳ (CL)، نسبت بازوها^۴ (AR)، شاخص سانترومری^۵ (CI) و همچنین فراسنجه (پارامتر)های تکامل کاربوتیپی شامل درصد شکل کلی کروموزوم^۶ (TF%) (Huziwarra, 1962)، شاخص نبود تقارن

7. Intrachromosomal Asymmetry Index
8. Interchromosomal Asymmetry Index
9. Difference of range relative length
10. Asymmetry index
11. Relative variation in chromosome length
12. Mean centromeric asymmetry
13. Relative length of chromosome

1. Long arm
2. Short arm
3. Chromosome length
4. Arm ratio
5. Centromer index
6. Total form percentage

بررسی‌هایی اشاره‌هایی شده است (Bauchan & Azhar, 1998). مهم‌ترین راهکارهایی که برای حل این نارسایی‌ها می‌توان به‌کار برد، استفاده از روش C باندینگ برای حل نارسایی‌های مربوط به همسانی‌بندی و همچنین استفاده از N باندینگ برای رؤیت ماهواره‌ها است (Bauchan & Campbell, 1994). رابطه کاربوتیپی در نژادگان ES-۰۵۴ (کریستای) به‌صورت ۱۶m و در نژادگان‌های ES-۰۲۴ (یزدی)، ES-۳۰۰۳ (فانو)، ES-۰۳۲ (ترتی)، ES-۰۱۱ (تهران)، ES-۰۵۸ (کدی)، ES-۰۵۰ (گران) و ES-۱۲۶ (اصفهان) به‌صورت ۱۵m+۱sm بود. رابطه کاربوتیپی در نژادگان‌های ES-۰۳۴ (بیرجند)، ES-۰۸۳ (فلاورجان)، ES-۰۳۶ (کرمان)، ES-۰۳۱ (مشهد) و ۱۹ (G۱۹)، به‌صورت ۱۴m+۲sm و برای نژادگان ES-۰۶۵ (زردشت) رابطه کاربوتیپی به‌صورت ۱۳m+۳sm است. برای نژادگان ES-۰۰۶ (سیرجان) رابطه کاربوتیپی به‌صورت ۱۲m+۴sm بود. همچنین در نژادگان ES-۲۱۱ (اصفهان) رابطه کاربوتیپی به‌صورت ۱۱m+۵sm، در نژادگان ES-۱۹۹ (کدی) رابطه کاربوتیپی به‌صورت ۱۰m+۶sm بود و برای نژادگان‌های ES-۰۲۷ (شاهرود) و ES-۰۳۷ (اصفهان) به‌صورت ۹m+۷sm بود، بنابراین شکل کروموزومی نژادگان‌های مورد بررسی متفاوت بود، و از نظر شکل کروموزومی تنوع درون نژادگان‌ها (بین نژادگان‌ها) مشاهده شد. به استثنای نژادگان‌های ES-۰۳۷ (اصفهان)، ES-۱۹۹ (کدی)، ES-۰۳۲ (ترتی)، ES-۰۳۴ (بیرجند) و ES-۰۶۵ (زردشت) که به ترتیب ۱، ۲، ۳ و ۱، ۳ و ۳ ماهواره داشتند در دیگر نژادگان‌ها ماهواره مشاهده نشد. بیشترین طول ماهواره در نژادگان ES-۰۳۷ (اصفهان)، (۰/۷۸۹ میکرون) و کمترین طول آن در نژادگان ES-۰۶۵ (زردشت)، (۰/۵۱۴ میکرون) مشاهده شد. این نتایج با نتایج بررسی‌های شماری از محققان که بر پایه رابطه کاربوتیپی، تنوع را در بین نژادگان‌های یونجه گزارش کرده‌اند همخوانی داشت (Azhar Hossain et al., 2001).

بر پایه جدول دوسویه Stebbins نژادگان‌های مورد بررسی در کلاس‌های تقارن مربوطه قرار گرفتند و

درصد استفاده شد. به‌منظور بررسی محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) در آغاز میزان ۵ میکرولیتر بافر نمونه گذاری به DNAهای افزونش‌شده اضافه و آنگاه میزان ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه به درون چاهک‌های ایجادشده در ژل آگارز لود و با ولتاژ ۱۰۰ و میزان ۲/۵ ساعت حرکت صورت گرفت و سپس ژل را برای رنگ‌آمیزی در محلول اتیدیوم برمایید (۱ میکروگرم در میکرولیتر) قرار داده و از دستگاه Gel Document برای نمایان شدن باندها استفاده شد. در پایان نیز با استفاده از نرم‌افزار Darwin 5 داده‌های به‌دست‌آمده بررسی شد. محتوای داده‌های چندشکلی^۱ (PIC) از رابطه زیر (Powell et al., 1996) محاسبه شد.

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n PI^2$$

نتایج و بحث

نتایج به‌دست‌آمده از بررسی سیتوژنتیک

مقایسه کاربوتیپی نژادگان‌ها

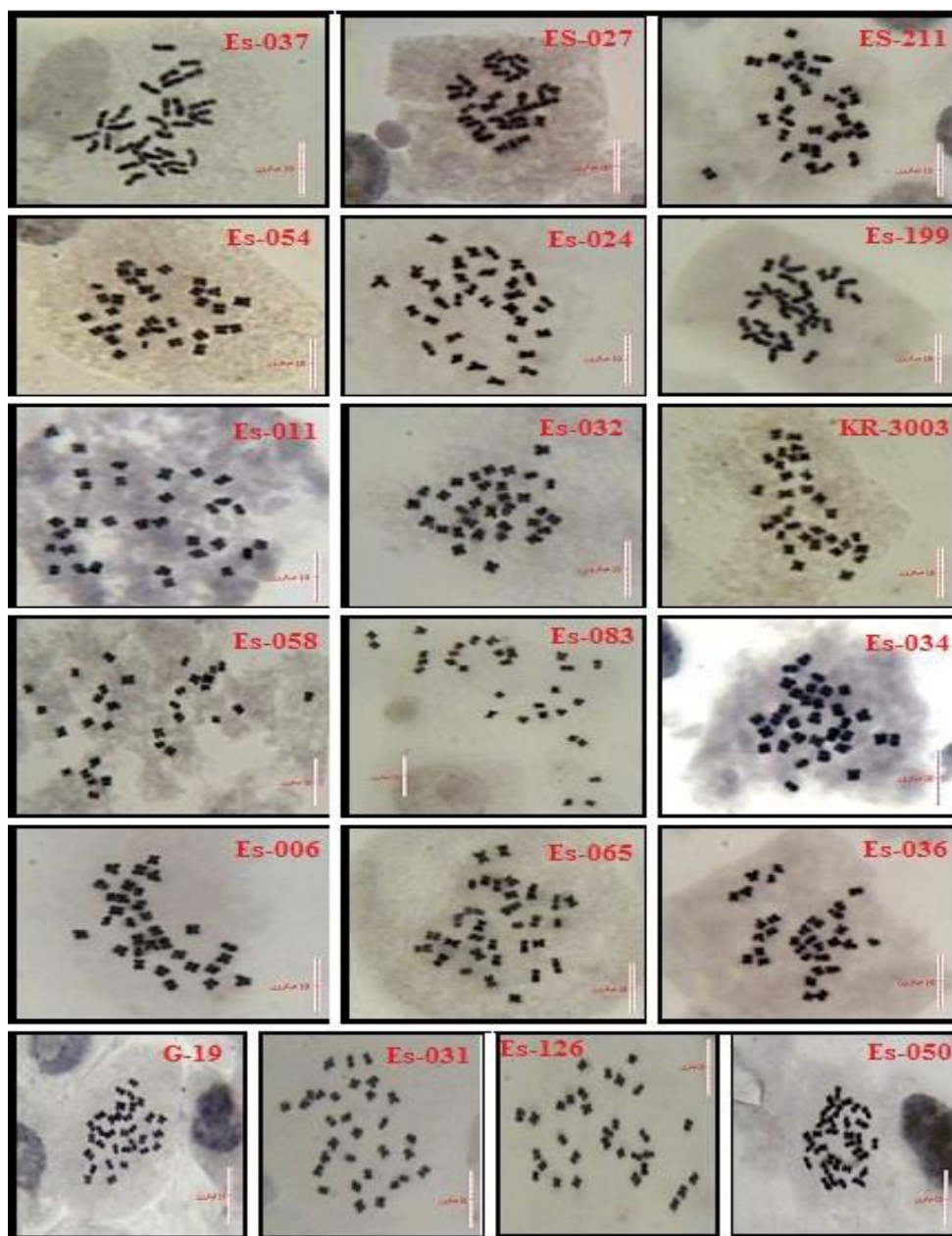
شکل ۱ تصویر یاخته‌های متافازی ۱۹ نژادگان از گونه *M. sativa* مورد بررسی را نشان می‌دهد. با توجه به بررسی‌های صورت گرفته در بین نژادگان‌ها از نظر سطح پلوئیدی و عدد پایه کروموزومی اختلافی دیده نشد و همه نژادگان‌های مورد بررسی تتراپلوئید، با شمار کروموزوم پایه (x=8) بودند و تنها از نظر رابطه کاربوتیپی (KF)، که با استفاده از روش Levan محاسبه شد (Levan et al., 1964)، در بین نژادگان‌ها تنوع وجود داشت (جدول ۲). این نتایج، با نتایج به‌دست‌آمده از بررسی‌هایی که روی یونجه صورت گرفته همخوانی داشت (Mortazavi, 2007; Bauchan et al., 1995).

در مورد بررسی‌های سیتوژنتیکی می‌توان به نارسایی‌هایی مانند دشواری همسانی (همولوگ)بندی کروموزوم‌ها به دلیل همانندی ریخت‌شناختی (مورفولوژیکی) آن‌ها و کوچک بودن کروموزوم‌ها و نقص در مورد تشخیص دقیق وجود یا نبود ماهواره اشاره کرد که در این موارد در بسیاری از منابع

^۱ Polymorphic information content

ES-۰۶۵ (زردشت)، ۱۹ (G۱۹) در کلاس ۲A قرار گرفتند. بنابراین بر پایه جدول دوسویه Stebbins نژادگانها کاربوتیپ تا حدودی متقارن داشتند و با توجه به اینکه همه نژادگانها در کلاس A قرار گرفتند و در این کلاس در دو دسته ۱A و ۲A بودند، بنابراین تنوع در بین نژادگانها بر پایه جدول دوسویه Stebbins بیشتر ناشی از عدم تقارن درون کروموزومی بوده و از لحاظ نبود تقارن بین کروموزومی تنوعی مشاهده نشد.

نتایج به دست آمده در جدول ۲ درج شد. برابر این جدول نژادگانهای ES-۰۲۷ (شاهرود)، ES-۰۲۴ (یزدی)، ES-۰۵۴ (کریستای)، ES-۰۳۲ (تربتی)، ES-۰۱۱ (تهران)، ES-۰۸۳ (فلورجان)، ES-۰۵۸ (کدی ۲)، ES-۰۳۶ (کرمان)، ES-۰۰۶ (سیرجان)، ES-۰۵۰ (گرگان)، ES-۱۲۶ (اصفهان ۳) و ES-۰۳۱ (مشهد) در کلاس ۱A، نژادگانهای ES-۲۱۱ (اصفهان ۱)، ES-۰۳۷ (اصفهان ۲)، ES-۱۹۹ (کدی ۱)، KR-۳۰۰۳ (فائو ۱)، ES-۰۳۴ (بیرجند)،



شکل ۱. یاخته‌های متافازی نژادگان‌های مورد بررسی یونجه
Figure 1. Metaphase cells in the studied genotypes of alfalfa

تکامل کاریوتیپی را داشتند و نژادگان‌های ES-083 (فلاورجان) و ES-006 (سیرجان) کمترین تکامل کاریوتیپی بر پایه میزان کروماتین را داشتند. شمار زیادی از محققان در نتایج بررسی‌های خود گزارش دادند، ارتباطی بین محتوای DNA بیشتر و سازگاری با آب‌وهوای خشک وجود دارد (Price *et al.*, 1981). تنوع میزان پایه DNA هسته در بهبود توانایی گیاه از لحاظ زندگی در محیط‌های متفاوت آب‌هوایی نقش دارد و اندازه ژنگان (ژنوم) همبستگی مثبتی با سردترین ماه سال دارد (Ceccarelli *et al.*, 1994) که در این پژوهش با توجه به ارزش نسبی کروماتین (VRC) بیشترین میزان کروماتین به ES-199 (کدی ۱)، (۲/۹۵ میکرون) و کمترین میزان آن به نژادگان ES-083 (فلاورجان)، (۱/۹۹ میکرون) اختصاص یافت در نتیجه نژادگان ES-199 (کدی ۱) احتمال سازگاری بیشتری به شرایط نامساعد محیطی نسبت به دیگر نژادگان‌های مورد بررسی دارد. بیشترین شاخص نبود تقارن (AI) را نژادگان‌های ES-211 (اصفهان ۱) و ES-199 (کدی ۱) و کمترین میزان را ES-037 (اصفهان ۲) داشت. همچنین بیشترین میزان تغییرات نسبی طول کروموزوم (CVCL)، میانگین نبود تقارن سانترومری (MCA)، انحراف معیار نسبت بازوها (r-value) و طول نسبی کروموزوم (RL%) مربوط به نژادگان ES-199 (کدی ۱) و کمترین میزان مربوط به نژادگان ES-058 (کدی ۲) بود. از شاخص‌های بالا در بسیاری از بررسی‌های کاریوتیپی استفاده شده است و بر پایه آن‌ها صفات تکامل و تقارن کاریوتیپی ارزیابی شده است (Kumari *et al.*, 2010, 2016; Paknia & Karimzadeh, 2011).

تجزیه واریانس و مقایسه میانگین

برای تعیین بود یا نبود تفاوت بین نژادگان‌ها، تجزیه واریانس بر پایه طرح کامل تصادفی با پنج تکرار انجام شد که میانگین مربعات تیمار به‌دست‌آمده از آن در جدول ۳ نشان داده شده است. بین نژادگان‌ها از نظر همه صفات کروموزومی مورد اندازه‌گیری بر پایه تجزیه واریانس اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد وجود داشت.

به‌منظور تعیین تقارن کاریوتیپی و بررسی وضعیت تکاملی نژادگان‌های مورد بررسی، فراسنجه‌هایی مانند شاخص نامتقارن بودن درون کروموزومی (A1)، شاخص نامتقارن بودن بین کروموزومی (A2)، اختلاف دامنه طول نسبی بزرگ‌ترین کروموزوم از کوچک‌ترین کروموزوم (DRL)، درصد شکل کلی (%TF) محاسبه شد. نژادگان ES-058 (کدی ۲) و ES-054 (کریستایوی)، بر پایه جدول ۲ نسبت به دیگر نژادگان‌ها شاخص نامتقارن بودن درون کروموزومی (A1) کمتر و درصد شکل کلی (%TF) بیشتری داشتند. بنابراین این نژادگان‌ها کمترین تکامل کاریوتیپی را بر پایه شاخص نامتقارن بودن درون کروموزومی (A1) کمتر و درصد شکل کلی (%TF) بیشتری داشتند. نژادگان ES-199 (کدی ۱)، ES-006 (سیرجان) و ES-027 (شاهرود) کروموزوم‌های نامتقارن‌تری نسبت به دیگر نژادگان‌ها بر پایه شاخص نامتقارن بودن درون کروموزومی (A1) کمتر و درصد شکل کلی (%TF) داشتند و از نظر تکاملی با توجه به این فراسنجه‌ها در درجه بالاتری قرار گرفتند. با توجه به شاخص نامتقارن بودن بین کروموزومی (A2) و اختلاف دامنه طول نسبی بزرگ‌ترین کروموزوم از کوچک‌ترین کروموزوم (DRL)، نژادگان‌های ES-211 (اصفهان ۱) و ES-027 (شاهرود)، ۱۹ (G19) و KR-3003 (فائو) بیشترین نبود تقارن بین کروموزومی را داشتند، و بر پایه این فراسنجه‌ها بیشترین تکامل کاریوتیپی را داشتند. نژادگان‌های ES-199 (کدی ۱)، ES-034 (بیرجند)، ES-037 (اصفهان ۲)، ES-032 (تربتی) و ES-056 (زردشت) کمترین نبود تقارن بین کروموزومی و کمترین تکامل کاریوتیپی را با توجه به این فراسنجه‌ها داشتند. با توجه به ارزش نسبی کروماتین (VRC) بیشترین میزان کروماتین به ES-199 (کدی ۱)، (۲/۹۵ میکرون) و ES-037 (اصفهان ۲)، (۲/۹۰ میکرون) و کمترین میزان آن به نژادگان‌های ES-083 (فلاورجان)، (۱/۹۹ میکرون) و ES-006 (سیرجان)، (۲/۰۷ میکرون) اختصاص یافت. بنابراین با توجه به ارزش نسبی کروماتین (VRC) می‌توان بیان داشت که نژادگان‌های ES-199 (کدی ۱) و ES-037 (اصفهان ۲) بیشترین

جدول ۲. فراسنجه‌های تقارن (تکامل) کاربوتیپی نژادگان‌های مورد بررسی یونجه

Table 2. Parameters of karyotype asymmetry in studied genotypes of alfalfa

Genotype	A1	A2	Stebbins	VRC	DRL	TF%	AI	CV _{CI}	M _{CA}	r-value	RL%
ES-211	0.312	0.178	2A	2.38	4.52	40.03	0.66	3.71	0.20	0.39	5.44
ES-027	0.350	0.154	1A	2.67	3.65	38.91	0.59	3.83	0.22	0.42	6.10
Es-037	0.272	0.008	2A	2.90	2.77	40.29	0.03	3.70	0.16	0.35	6.63
Es-199	0.362	0.010	2A	2.95	2.79	38.10	0.04	3.92	0.23	0.44	6.75
Es-024	0.281	0.116	1A	2.27	2.81	40.28	0.42	3.60	0.17	0.36	5.19
Es-054	0.225	0.128	1A	2.14	2.95	43.39	0.44	3.43	0.13	0.31	4.90
KR-3003	0.278	0.144	2A	2.10	3.45	41.39	0.52	3.59	0.17	0.35	4.80
Es-032	0.264	0.012	1A	2.18	2.61	42.02	0.04	3.56	0.16	0.34	5.00
Es-011	0.269	0.112	1A	2.23	2.49	41.97	0.40	3.56	0.16	0.34	5.11
Es-034	0.292	0.013	2A	2.19	3.21	40.51	0.05	3.67	0.18	0.37	5.00
Es-083	0.305	0.119	1A	1.99	2.83	40.77	0.44	3.66	0.18	0.37	4.56
Es-058	0.201	0.104	1A	2.03	2.40	44.08	0.35	3.38	0.12	0.29	4.65
Es-036	0.326	0.136	1A	2.10	3.20	39.93	0.51	3.73	0.20	0.39	4.81
Es-065	0.292	0.016	1A	2.58	3.91	39.92	0.06	3.71	0.18	0.37	5.90
Es-006	0.344	0.098	1A	2.07	2.32	39.92	0.37	3.80	0.21	0.41	4.74
Es-050	0.254	0.119	1A	2.30	2.57	42.55	0.42	3.51	0.15	0.33	5.25
Es-126	0.308	0.118	1A	2.23	2.72	40.76	0.43	3.67	0.18	0.37	5.09
Es-031	0.274	0.113	1A	2.18	2.58	41.74	0.40	3.58	0.16	0.35	4.99
G-19	0.320	0.150	2A	2.23	3.39	39.90	0.56	3.71	0.20	0.39	5.09

جدول ۳. تجزیه واریانس ویژگی‌های کاربوتیپی نژادگان‌های یونجه

Table 3. Analysis of variance of karyotypic characteristics of *M. sativa* genotypes

S.O.V	D.F.	Mean of Squares				
		CL	L	S	AR	CI
Genotypes	18	0.383**	0.143**	0.045**	0.001**	0.045**
Error	76	0.002	0.001	0.001	0.0001	0.006
CV (%)		1.92%	2.64%	3.75%	2.86%	5.11%

** Significant at 1% probability levels.

** اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

(S)، نژادگان‌های ES-۰۳۷ (اصفهان ۲) و ES-۱۹۹ (کدی ۱) با بیشترین میانگین طول بازوی کوتاه در گروه a قرار گرفتند و با دیگر نژادگان‌ها اختلاف معنی‌دار داشتند و نژادگان‌های ES-۰۸۳ (فلاورجان) و ES-۰۰۶ (سیرجان ۲) کمترین میزان میانگین طول بازوی کوتاه را به خود اختصاص دادند و در گروه h قرار گرفتند و با نژادگان‌های ES-۳۰۰۳ (فائو ۱) و ES-۰۳۶ (کرمان) اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد نداشتند. نژادگان ES-۱۹۹ (کدی ۱) بر پایه نسبت بازوها (AR) نامتقارن‌ترین کروموزوم را داشت و در گروه a قرار گرفت که با نژادگان‌های ES-۰۲۷ (شاهرود) و ES-۰۰۶ (سیرجان) اختلاف معنی‌دار نداشت و نژادگان ES-۰۵۸ (کدی ۲) کمترین نسبت بازوها (AR) و متقارن‌ترین کروموزوم‌ها بر پایه این صفت را داشت که به نژادگان‌های ES-۰۵۴ (کریستایو)، ES-۰۳۲ (تربتی)، ES-۰۱۱ (تهران) و ES-۰۵۰ (گرگان) اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد نداشت. همچنان‌که ملاحظه شد روند مقایسه میانگین‌ها برای چهار صفت CL، LA، SA و AR تا

با استفاده از آزمون کمترین اختلاف معنی‌دار (LSD) نژادگان‌ها برای صفات مورد بررسی، در سطح احتمال ۱ درصد مقایسه و دسته‌بندی شدند (جدول ۴). با توجه به مقایسه میانگین‌ها برای طول کروموزوم (CL) نژادگان‌های ES-۰۳۷ (اصفهان ۲) و ES-۱۹۹ (کدی ۱) با میانگین طول کل ۲/۹۰ و ۲/۹۵ میکرومتر در گروه a قرار گرفتند و بیشترین طول کروموزومی را داشتند و نژادگان ES-۰۸۳ (فلاورجان) با کمترین میانگین طول کروموزومی در گروه z قرار گرفت و کوتاه‌ترین میانگین طول کروموزومی را به خود اختصاص داد و با نژادگان ES-۰۵۸ (کدی ۲) اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد نداشت. برای صفت طول بازوی بلند (L) نژادگان ES-۱۹۹ (کدی ۱) با طول بازوی بلند ۱/۷۹ میکرومتر در بیشترین میانگین طول بازوی بلند را داشت و در گروه a قرار گرفت و نژادگان ES-۰۵۸ (کدی ۲) با کمترین میانگین طول بازوی بلند، در گروه k قرار گرفت که با نژادگان ES-۰۸۳ (فلاورجان) اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد نداشت. برای طول بازوی کوتاه

در جدول ۵ ارائه شده است. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، طول کل کروموزوم (CL) با ویژگی‌های طول بازوی بلند (L) و طول بازوی کوتاه (S) همبستگی مثبت و معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد و با صفت شاخص سانترومیری (CI) همبستگی منفی و معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد نشان داد. بنابراین می‌توان بیان داشت با افزایش طول کل کروموزوم‌ها نسبت بازوها یا به‌عبارت‌دیگر نبود تقارن نیز بیشتر شد. پس می‌توان نتیجه‌گیری کرد که تکامل در گیاه یونجه هم از راه افزایش میزان کروماتین و هم از راه نبود تقارن درون کروموزومی است. این نکته به‌خوبی با وجود ارتباط مثبت اما نامعنی‌دار طول کل کروموزوم با شاخص نامتقارن بودن درون کروموزومی (A1) نیز تا حدودی قابل تأیید است. اما ارتباط منفی بین شاخص نامتقارن بودن بین کروموزومی (A2) با طول کل کروموزوم بیانگر این مسئله است که افزایش طولی کروموزوم‌ها باعث کاهش نبود تقارن بین کروموزومی شده است و به همین دلیل می‌توان به‌خوبی بیان داشت که عامل نبود تقارن بین کروموزومی در تکامل یونجه نقش زیادی نداشته که این مسئله با جدول دوسویه Stebbins نیز تأیید شد.

حدودی همانند هم بود. اما برای صفت شاخص سانترومیری (CI)، بین نژادگان‌های مختلف این روند وجود نداشت. برای صفت شاخص سانترومیری (CI) نژادگان ES-۰۵۸ (کدی ۲) با بیشترین میزان، کمترین تقارن کروموزومی را داشت و با نژادگان‌های ES-۰۵۴ (کریستوسی) و ES-۰۵۰ (گرگان ۲) اختلاف معنی‌دار نداشت. از سوی دیگر کمترین شاخص سانترومیری (CI) به نژادگان ES-۱۹۹ (کدی ۱) تعلق گرفت که این نژادگان بیشترین نبود تقارن بین کروموزومی را داشت که با نژادگان‌های ES-۰۲۷ (شاهرود)، ES-۰۳۶ (کرمان)، ES-۰۶۵ (زردشت ۱)، ES-۰۰۶ (سیرجان ۲) و ۱۹ (G1۹) اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد نداشت. تنوع ژنتیکی بر پایه صفات کاربوتیبی بین جمعیت‌های یونجه در بسیاری از بررسی‌های صورت گرفته گزارش شده است (Marvian *et al.*, 2002; Mortazavi, 2007).

همبستگی کاربوتیبی صفات

ضریب‌های همبستگی پدیدگانی (فنونیبی)، بین صفات کاربوتیبی مورد بررسی و فراسنجه‌های شاخص نامتقارن بودن درون کروموزومی (A1)، شاخص نامتقارن بودن بین کروموزومی (A2) محاسبه شد که

جدول ۴. مقایسه میانگین ویژگی‌های کاربوتیبی در نژادگان‌های مورد بررسی یونجه به روش LSD در سطح احتمال ۱ درصد

Table 4. Mean comparison for karyotypic characteristics of *M. sativa* genotypes based on LSD method at 1% of probability level

Genotypes	(CL) Chromosome length	(L) Long arm	(S) Short arm	(CI) Centromeric index	(AR) Arm ratio
ES-211	2.381 ^d	1.42 ^d	0.953 ^{cd}	0.404 ^{efgh}	1.520 ^{bcd}
ES-027	2.666 ^b	1.62 ^b	1.037 ^b	0.391 ^{hi}	1.593 ^{ab}
Es-037	2.900 ^a	1.61 ^b	1.168 ^a	0.405 ^{defgh}	1.420 ^{defg}
Es-199	2.952 ^a	1.79 ^a	1.125 ^a	0.382 ⁱ	1.653 ^a
Es-024	2.270 ^e	1.333 ^e	0.937 ^{cde}	0.416 ^{cdef}	1.444 ^{cdef}
Es-054	2.145 ^{gh}	1.214 ^{ij}	0.931 ^{cde}	0.436 ^{ab}	1.311 ^{gh}
KR-3003	2.10 ^{hi}	1.233 ^{hij}	0.871 ^{fg}	0.417 ^{cdef}	1.425 ^{defg}
Es-032	2.185 ^{fg}	1.260 ^{ghi}	0.918 ^{def}	0.421 ^{bcd}	1.388 ^{fgh}
Es-011	2.234 ^{ef}	1.297 ^{efg}	0.938 ^{cde}	0.421 ^{bcd}	1.399 ^{efgh}
Es-034	2.187 ^{fg}	1.277 ^{fgh}	0.886 ^{efg}	0.408 ^{defg}	1.476 ^{bcd}
Es-083	1.993 ^j	1.181 ^{jk}	0.813 ^b	0.409 ^{defg}	1.474 ^{bcd}
Es-058	2.033 ^{ij}	1.137 ^k	0.896 ^{ef}	0.443 ^a	1.271 ^h
Es-036	2.1032 ^{hi}	1.263 ^{gh}	0.840 ^{gh}	0.401 ^{fgh}	1.536 ^{abcd}
Es-065	2.582 ^c	1.491 ^c	1.031 ^b	0.404 ^{efgh}	1.473 ^{bcd}
Es-006	2.072 ^{hi}	1.258 ^{ghi}	0.814 ^b	0.394 ^{ghi}	1.567 ^{abc}
Es-050	2.296 ^e	1.319 ^{ef}	0.977 ^c	0.426 ^{bc}	1.365 ^{fgh}
Es-126	2.228 ^{ef}	1.320 ^{ef}	0.908 ^{def}	0.408 ^{defg}	1.471 ^{bcd}
Es-031	2.181 ^{fg}	1.271 ^{fgh}	0.911 ^{def}	0.418 ^{cdi}	1.418 ^{defg}
G-19	2.227 ^{ef}	1.338 ^e	0.888 ^{efg}	0.403 ^{efgh}	1.524 ^{abcde}
LSD	0.074	0.052	0.052	0.016	0.129

در هر ستون، میانگین‌هایی که با حرف‌های لاتین مشترک نمایش داده شده‌اند از نظر آماری در یک گروه قرار می‌گیرند و تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد با یکدیگر ندارند.

جدول ۵. همبستگی ویژگی‌های کاربوتیپی در نژادگان‌های یونجه مورد بررسی

Table 5. Simple coefficient correlation between karyotypic characteristics in studied *M. sativa* genotypes

Characters	Chromosome length (CL)	Long arm (L)	Short arm (S)	Centromeric index (CI)	Arm ratio (AR)	Inter chromosome Asymmetry index (AI)
L	0.973**	1				
S	0.965**	0.871**	1			
CI	-0.555*	-0.699**	-0.288	1		
AR	0.437	0.617**	0.157	-0.972**	1	
A1	0.372	0.558*	0.090	-0.964**	0.990**	1
A2	-0.452	-0.353	-0.467*	0.159	-0.170	0.350

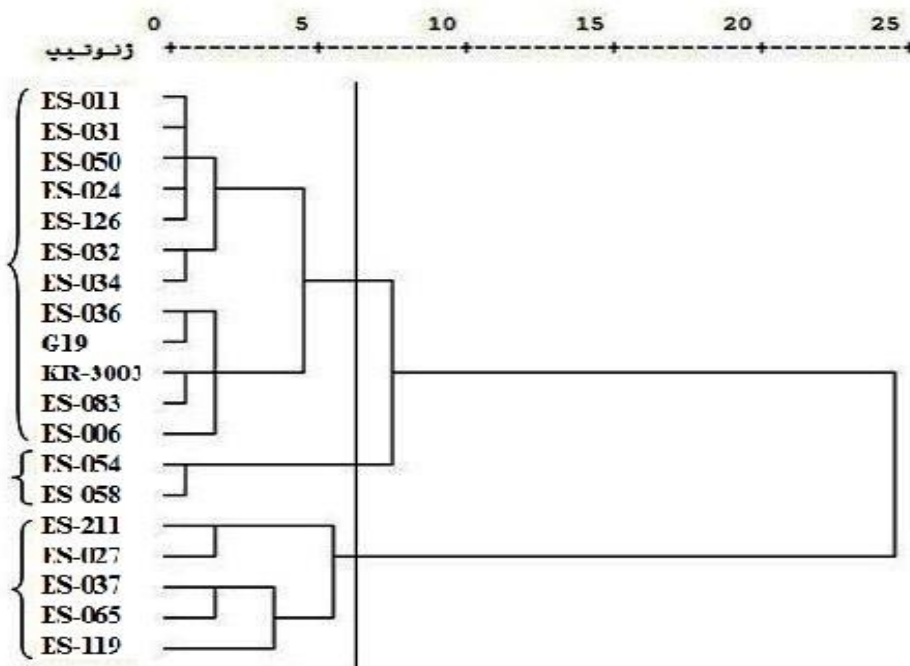
** Significant at 1% probability levels.

** اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

تجزیه خوشه‌ای

(بیرجند)، ES-۰۸۳ (فلورجان)، ES-۰۳۶ (کرمان)، ES-۰۰۶ (سیرجان)، ES-۰۵۰ (گرگان)، ES-۱۲۶ (اصفهان ۳)، ES-۰۳۱ (مشهد) و G۱۹ (ناشناخته) بودند. در خوشه دوم دو نژادگان ES-۰۵۴ (کریستای) و ES-۰۵۸ (کدی ۲) قرار گرفتند که نژادگان‌های این گروه و گروه اول پایین‌ترین تکامل کاربوتیپی را داشتند. خوشه سوم شامل پنج نژادگان ES-۲۱۱ (اصفهان ۱)، ES-۰۲۷ (شاهرود)، ES-۰۳۷ (اصفهان ۲)، ES-۱۹۹ (کدی ۱) و ES-۰۶۵ (زردشت) هستند. نژادگان‌های این گروه بیشترین تکامل کاربوتیپی و بیشترین میزان کروماتین را داشتند، این نتیجه با نتیجه مقایسه میانگین‌ها تا حد بالایی همخوانی داشت.

با توجه به اینکه صفات طول بازوی بلند (L)، طول بازوی کوتاه (S)، طول کروموزوم (CL)، نسبت بازوها (AR) و شاخص سانترومیری (CI) بر پایه تجزیه واریانس در تنوع درون نژادگان‌های مورد بررسی نقش داشتند، بنابراین با استفاده از این صفات برای نژادگان‌ها، به روش Ward تجزیه خوشه‌ای (کلاستر) انجام شد، نمودار شجره‌ای (دندروگرام) به دست آمده در شکل ۲ ارائه شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود با برش نمودار شجره‌ای نژادگان‌ها در سه خوشه قرار گرفتند. بنا بر نمودار شجره‌ای خوشه اول شامل ۱۲ نژادگان ES-۰۲۴ (یزد)، ES-۳۰۰۳ (فائو)، ES-۰۳۲ (تربتی)، ES-۰۱۱ (تهران)، ES-۰۳۴



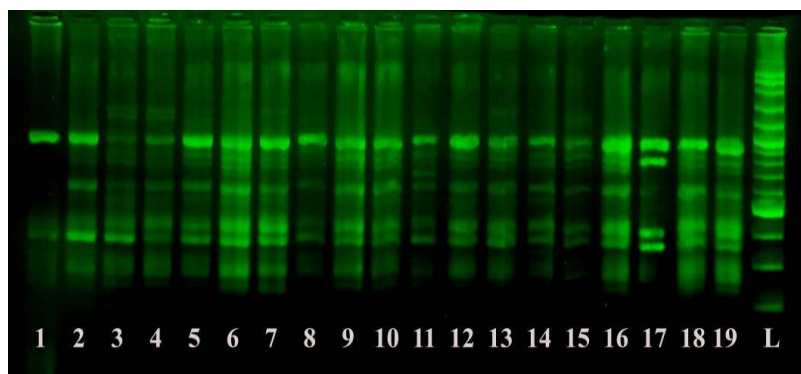
شکل ۲. نمودار شجره‌ای تجزیه خوشه‌ای ویژگی‌های کروموزومی برای نژادگان‌های مورد یونجه با استفاده از روش Ward

Figure 2. Dendrogram based on Ward method of cluster analysis for karyotypic characteristics

به‌دست‌آمده برای آغازگرهای استفاده شده در جدول ۶ نشان داده شده است. بیشترین میزان محتوای داده‌های چندشکلی (PIC) مربوط به آغازگرهای IS_۹ و IS_{۱۳} بود که این آغازگرها بهتر از دیگر آغازگرها توانستند فاصله ژنتیکی نژادگان‌ها را مشخص کنند. بنابراین می‌توان از این آغازگرها برای تجزیه مجموعه ذخایر توارثی (ژرم‌پلاس) دیگر نژادگان‌های یونجه در تحقیق‌های بعدی استفاده کرد. آغازگر IS_۵ و IS_{۱۶} با کمترین میزان محتوای داده‌های چندشکلی (PIC) توانایی خوبی در جداسازی نژادگان‌ها نداشت. با توجه به اینکه مقادیر محتوای داده‌های چندشکلی (PIC) از صفر تا نیم در نشانگرهای غالب متغیر است و هرچه این عدد بزرگ‌تر باشد بیانگر فراوانی بیشتر چندشکلی برای آن جایگاه در نژادگان تحت بررسی است. نتایج بررسی‌های مولکولی نشان داد تنوع به نسبت خوبی بین نژادگان‌های مورد بررسی وجود داشت که این موضوع تاییدکننده نتایج بررسی‌های پیشین است که در بین نژادگان‌ها از نظر مولکولی تنوع بالایی وجود دارد (Bernadette *et al.*, 2003; Ghanavati *et al.*, 2006).

نتایج به‌دست‌آمده از بررسی نشانگر مولکولی ISSR
تنوع ژنتیکی نژادگان‌های یونجه مورد بررسی با استفاده از هشت آغازگر ISSR بررسی شد. آغازگرهای ISSR در مجموع توانستند ۳۷ مکان ژنی را شناسایی کنند که از این شمار هشت نوار یک شکل مشاهده شد و دیگر نوارها چند شکل بودند، که آغازگر IS_۵ بیشترین شمار نوار (۷) و آغازگرهای IS_۱، IS_۹ و IS_{۱۶} کمترین شمار نوار (۳) را نشان دادند. شکل ۳ الگوی نواری نژادگان‌ها با استفاده از آغازگر IS_۳ را برای ۱۹ نژادگان نشان می‌دهد. گزارش‌های چندی در ارتباط با وجود تنوع ژنتیکی در بین نژادگان‌های یونجه منتشر شده است که با نتایج بالا همخوانی دارد (Ellwood *et al.*, 2006; Sandrine *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2009).

کمترین میزان درصد چندشکلی را آغازگرهای IS_{۱۴} و IS_{۱۵} (۰.۵۰٪) و IS_۵ (۰.۵۷/۱۴٪) داشتند و درصد چندشکلی برای دیگر آغازگرها ۱۰۰ درصد است، همچنین میانگین درصد چندشکلی برابر ۸۶ درصد بود. میانگین شمار نوارهای تولیدشده توسط هر آغازگر برای ۱۹ نژادگان برابر ۴/۶۲ به‌دست آمد، نتایج



شکل ۳. الگوی نواری ۱۹ نژادگان یونجه با استفاده از آغازگر IS_۳
Figure 3. The band pattern for 19 alfalfa genotypes using IS₃ primer

جدول ۶. درصد چندشکلی، شمار کل نوارها و محتوای داده‌های چندشکلی در آغازگرهای مورد استفاده

Table 6. ISSR primers used in this study and some summary results

Primer number	Primer sequence	Number of bands	Number of polymorphism band	Percent of polymorphism band	Polymorphic information content
IS1	5'- ACACACACACACACACYC-3'	3	3	100%	0.27
IS3	5'- GAGAGAGAGAGAGAGAYC-3'	5	5	100%	0.35
IS5	5'- AGAGAGAGAGAGAGAGGC-3'	7	4	57.14%	0.22
IS9	5'- CTCTCTCTCTCTCTG-3'	3	3	100%	0.46
IS13	5'- AGAGAGAGAGAGAGAGYT-3'	6	6	100%	0.47
IS14	5'- GACAGACAGACAGACA -3'	4	2	50%	0.24
IS15	5'- GGATGGATGGATGGAT -3'	6	3	50%	0.36
IS16	5'-DBDACACACACACACA-3'	3	3	100%	0.22
Mean		4.62	3.62	86%	0.32

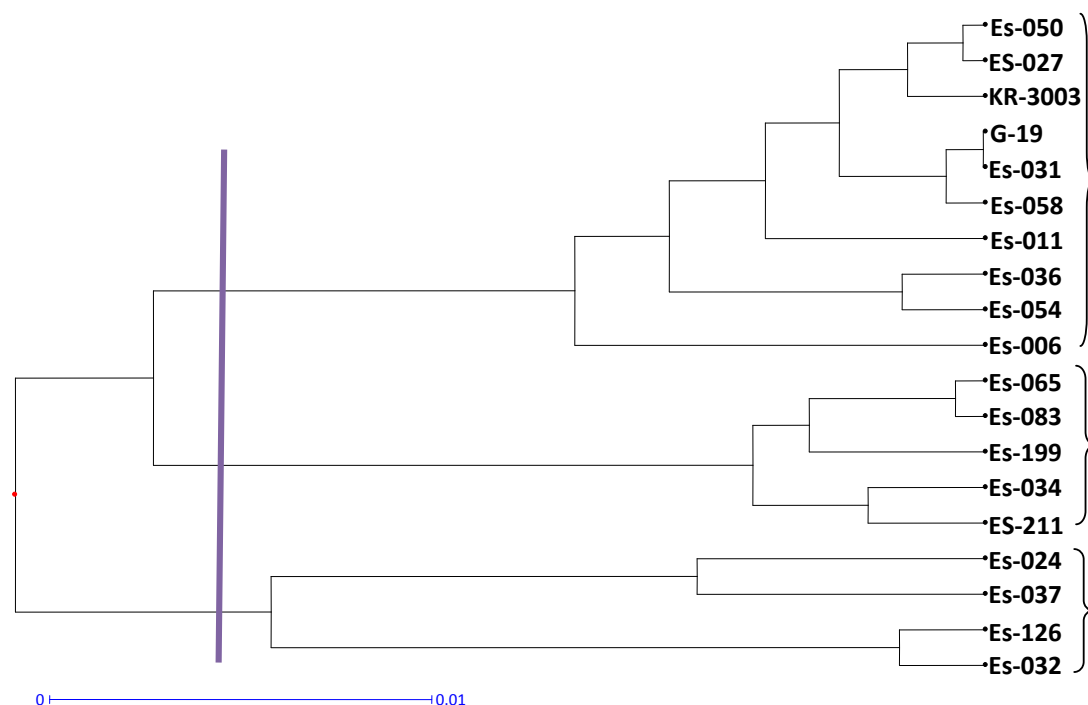
ماتریس تشابه

تشابه ژنتیکی نژادگان‌های مورد بررسی با استفاده از ضریب تشابه دایس^۱ از ۰/۷۰۵ تا ۰/۹۸۳ متغیر بود، میانگین تشابه بین نژادگان‌ها برابر ۰/۸۴۳ بود. بیشترین تشابه را نژادگان‌های ES-۰۳۱ (مشهد) و G-۱۹ (ناشناخته) از گروه ۳ و کمترین تشابه را نژادگان ES-۲۱۱ (اصفهان) از گروه ۲ و نژادگان ES-۰۰۶ (سیرجان) از گروه ۳ داشتند (جدول ۷).

تجزیه خوشه‌ای

نمودار شجره‌ای به‌دست‌آمده از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA بر پایه ضریب تشابه دایس در شکل ۴ آمده است. که بر پایه آن نژادگان‌ها در سه گروه گرفتند. که گروه اول شامل نژادگان‌های ES-۰۳۷ (اصفهان ۲)، ES-۰۲۴ (یزد)، ES-۰۳۲ (تربت) و ES-۱۲۶ (اصفهان ۳) است. میانگین تشابه نژادگان‌های این گروه برابر ۰/۸۱۲ است که در بین نژادگان‌های این گروه، نژادگان‌های ES-۰۳۲ (تربت) و ES-۱۲۶

(اصفهان ۳) بیشترین تشابه و نژادگان‌های ES-۰۳۷ (اصفهان ۲) و ES-۱۲۶ (اصفهان ۳) کمترین تشابه را داشتند. در گروه دوم نژادگان‌های ES-۲۱۱ (اصفهان ۱)، ES-۱۹۹ (کدی ۱)، ES-۰۳۴ (بیرجند)، ES-۰۸۳ (فلورجان) و ES-۰۶۵ (زردشت) قرار گرفتند. میانگین تشابه این گروه ۰/۸۸۱، که نژادگان‌های ES-۱۹۹ (کدی ۱) و ES-۰۳۴ (بیرجند) کمترین تشابه و نژادگان‌های ES-۰۸۳ (فلورجان) و ES-۰۶۵ (زردشت) بیشترین تشابه را با یکدیگر داشتند. گروه سوم شامل نژادگان‌های ES-۰۲۷ (شاهرود)، ES-۰۵۴ (کریستاوی)، ES-۳۰۰۳ (فائو)، ES-۰۱۱ (تهران)، ES-۰۵۸ (کدی ۲)، ES-۰۳۶ (کرمان)، ES-۰۰۶ (سیرجان)، ES-۰۵۰ (گرگان)، ES-۰۳۱ (مشهد) و G۱۹ (ناشناخته) است. میانگین تشابه در این گروه ۰/۸۸۵ بود که در بین نژادگان‌های این گروه نژادگان‌های G۱۹ (ناشناخته) و ES-۰۳۱ (مشهد) بیشترین تشابه و نژادگان‌های ES-۰۵۸ (کدی ۲) و ES-۰۰۶ (سیرجان) کمترین تشابه را دارند.



شکل ۴. نمودار شجره‌ای به‌دست‌آمده از داده‌های نشانگر ISSR برای نژادگان‌های مورد بررسی یونجه با استفاده از روش UPGMA

Figure 4. Dendrogram of cluster analysis for alfalfa genotypes using ISSR marker based Dice's coefficient by UPGMA

جدول ۷. ماتریس تشابه با استفاده از ضریب تشابه دایس برای نژادگان های مورد بررسی یونجه

Table 7. Similarity matrix for studying alfalfa genotypes based on Dice's coefficient

	ES-211	ES-027	ES-037	ES-199	ES-024	ES-054	KR-3003	ES-032	ES-011	ES-034	ES-083	ES-058	ES-036	ES-065	ES-006	ES-050	ES-126	ES-031	
ES-027	0.87	1																	
ES-037	0.85	0.85	1																
ES-199	0.81	0.85	0.82	1															
ES-024	0.78	0.82	0.79	0.75	1														
ES-054	0.76	0.86	0.73	0.73	0.78	1													
KR-3003	0.75	0.89	0.79	0.75	0.81	0.84	1												
ES-032	0.81	0.77	0.73	0.82	0.75	0.73	0.72	1											
ES-011	0.82	0.89	0.75	0.75	0.74	0.88	0.81	0.72	1										
ES-034	0.82	0.81	0.70	0.83	0.68	0.74	0.80	0.78	0.80	1									
ES-083	0.82	0.82	0.72	0.75	0.81	0.88	0.84	0.72	0.81	0.80	1								
ES-058	0.81	0.88	0.82	0.82	0.72	0.80	0.86	0.82	0.83	0.82	0.76	1							
ES-036	0.75	0.85	0.75	0.72	0.81	0.91	0.87	0.68	0.84	0.76	0.87	0.83	1						
ES-065	0.77	0.81	0.69	0.82	0.75	0.77	0.86	0.78	0.76	0.90	0.86	0.81	0.76	1					
ES-006	0.71	0.82	0.71	0.63	0.77	0.78	0.81	0.67	0.81	0.68	0.74	0.75	0.84	0.68	1				
ES-050	0.79	0.92	0.76	0.76	0.81	0.91	0.91	0.76	0.88	0.77	0.88	0.83	0.88	0.83	0.85	1			
ES-126	0.79	0.79	0.72	0.68	0.78	0.85	0.75	0.76	0.88	0.65	0.78	0.69	0.78	0.65	0.74	0.85	1		
ES-031	0.78	0.85	0.75	0.82	0.73	0.84	0.87	0.82	0.87	0.87	0.80	0.89	0.80	0.89	0.73	0.87	0.77	1	
G-19	0.76	0.83	0.73	0.81	0.75	0.83	0.89	0.81	0.85	0.85	0.82	0.88	0.79	0.91	0.71	0.86	0.76	0.98	

نتیجه گیری

شباهت بیشتری داشتند. از سوی دیگر نژادگان هایی که میزان کروماتین و تقارن کروموزومی پائینی داشتند در دسته نژادگان هایی قرار گرفتند که بر پایه بررسی های مولکولی شباهت بیشتری داشتند. لذا نتایج به دست آمده، یکی از مهم ترین فرضیه های تحقیق بود که وجود ارتباط میان نتایج به دست آمده از به کارگیری نشانگرهای مختلف مورد استفاده را تأیید کرد. بنابراین با به کارگیری ترکیبی از نشانگرها می توان دستیابی به هدف های اصلاحی را پیش بینی و تحقق آن ها را تسریع بخشید. از سویی با توجه به اینکه این نژادگان ها بر پایه بررسی های سیتوژنتیکی، به ترتیب در گروه نژادگان های با بیشترین و کمترین تکامل کاربوتیپی قرار دارند لذا می توان پیشنهاد کرد که اگر هدف استفاده از پدیده دورگ برتری است از نژادگان هایی که تکامل کاربوتیپی بالا و یا آن هایی که تکامل کاربوتیپی پایینی دارند استفاده کرد. در نهایت بنا بر نتایج به دست آمده پیشنهاد می شود که در برنامه های اصلاحی از نژادگان هایی که تکامل کاربوتیپی بالایی دارند مانند ES-050 (گرگان)، ES-024 (یزد)، ES-011 (تهران)، ES-031 (مشهد)، ES-083 (فلاورجان)، ES-036 (کرمان)، ES-126 (اصفهان ۳)، ES-034 (بیرجند)، ES-032 (ترتبی) و

ارزیابی نژادگان های مورد بررسی نشان داد، بیشترین تکامل کاربوتیپی مربوط به نژادگان های ES-211 (اصفهان ۱)، ES-027 (شاهرود)، ES-199 (کدی ۱)، ES-065 (زردشت) و G19 (ناشناخته) بود. که بیشتر این نژادگان ها بر پایه نمودار تجزیه خوشه ای به دست آمده از گروه بندی نژادگان ها بر پایه مارکر در گروه دوم قرار داشتند بنابراین این گروه از تجزیه خوشه ای به دست آمده از نشانگرهای مولکولی حاوی نژادگان هایی بود که بیشترین تکامل کاربوتیپی را داشتند. از سوی دیگر نژادگان های ES-050 (گرگان)، ES-024 (یزد)، ES-011 (تهران)، ES-031 (مشهد)، ES-083 (فلاورجان)، ES-036 (کرمان)، ES-126 (اصفهان ۳)، ES-034 (بیرجند)، ES-032 (ترتبی) و ES-006 (سیرجان) که با توجه به بررسی های سیتوژنتیکی تکامل کاربوتیپی پایینی داشتند، بر پایه بررسی های مولکولی در گروه سوم قرار گرفتند. این نتایج بیان گر آن است که بین تکامل کاربوتیپی و تنوع بر پایه نشانگر تا حد مطلوبی ارتباط وجود دارد و در نهایت می توان بیان داشت که نژادگان هایی که بر پایه تجزیه سیتوژنتیکی تکامل کاربوتیپی داشتند، نژادگان هایی بودند که بر پایه بررسی های مولکولی نیز

سیاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه پیامنور انجام گرفته و همه حقوق مادی و معنوی آن متعلق به دانشگاه پیامنور است. بدین وسیله از مسئولان مربوط دانشگاه، تشکر و قدردانی می‌گردد.

ES-۰۰۶ (سیرجان) استفاده شود. همچنین در صورتی که هدف استفاده از پدیده دورگ برتری باشد از نژادگان‌های ES-۲۱۱ (اصفهان ۱) و ES-۰۰۶ (سیرجان) نیز استفاده شود که بر پایه تجزیه مولکولی بیشترین فاصله ژنتیکی را دارند.

REFERENCES

1. Arano, H. & Satio, H. (1980). Cytological studies in family Umbelliferae 5. Karyotypes of seven species in *subtribe Seselinae*. *Kromosomo*, 2(17), 471-480.
2. Azhar Hossain, M. & Bauchan, G. R. (2001). Distribution and characterization of heterochromatic DNA in the tetraploid African populations of alfalfa Genome. *Crop Science*, 41, 1921-1926.
3. Azizi, N., Amirouche, R. & Amirouche, N. (2016). Cytotaxonomic Diversity of some Medicinal Species of Hyacinthaceae from Algeria. *Pharmacogn*, 6(1), 34-38.
4. Barcaccia, G., Albertin, E., Tavoletti, S., Falcinelli, M. & Veronesi, F. (1999). AFLP fingerprinting in *Medicago* spp: its development and application in linkage mapping. *Plant Breeding*, 118, 335-341.
5. Barnes, D. K., Bingham, E., Murphy, T., Hunt, R. P., Beard, O. J., Skrdla, D. F. & Teuber, L. R. (1977). Alfalfa Germplasm in the United States: Genetic Vulnerability, Use, Improvement and Maintenance. U.S. Department of Agriculture, U.S. Printing Office. *Technical Bulletin*, 1571.
6. Bauchan, G. R. & Azhar Hossain, M. (1998). Karyotypic analysis of C-banded chromosomes of diploid alfalfa: *Medicago sativa* ssp. *caerulea* and ssp. *falcata* and their hybrid. *Journal of Heredity*, 89, 191-193.
7. Bauchan, G. R. & Campbell, T. A. (1994). Use of an image analysis system to karyotype alfalfa, *Medicago sativa*. *Heredity*, 85, 18-22.
8. Bauchan, G. R., Small, E., Brooks, B. & Auricht, G. C. (1995). A systematic comparison of early- and late-flowering forms of *Medicago scutellata*. *Canadian Journal of Botany*, 71, 183-192.
9. Bernadette, J., Sandrine, V., Philippe, B., Gaele, C., Sylvain, S., Thierry, H. & Christian, H. (2003). Construction of two genetic linkage maps in cultivated tetraploid alfalfa (*Medicago sativa*) using microsatellite and AFLP markers. *BMC Plant Biology*, 3, 1-19.
10. Brantestam, A. K., Botheme, R. V., Dayteg, Ch., Rashall, Tuveesson, S. & Weibull, J. (2004). Inter simple sequence repeat analysis of diversity and relationships in cultivated burly of Nordic and Baltic origin. *Hereditas*, 141, 186-192.
11. Brummer, E. C. (1999). Capturing hetrosis in forage crop cultivar development. *Crop Science*, 939- 943.
12. Ceccarelli, M. S., Minelli, M., Falcinelli, M. & Cionini, P. G. (1994). Genome size and plant development in hexaploid *Fustuca arundinacea*. *Heredity*, 71 555-560 Chawla, H.S. 2004. *Labroratory Manual for plant Biotechnology*.
13. Diwan, N., Bhagwat, A. A., Bauchan, G. R. & Cregan, P. B. (1997). Simple sequence repeat (SSR) DNA markers in alfalfa and perennial and annual *Medicago* species. *Genome*, 40, 887-895.
14. Doyle, J. J. & Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull*, 19, 11-15.
15. Ellwood, S. E., D'Souza, N. K., Kamphuis, L. G., Burgess, T. I., Nair, R. M. & Oliver, R. P. (2006). SSR analysis of the *Medicago truncatula* SARDI core collection reveals substantial diversity and unusual genotype dispersal throughout the Mediterranean basin. *Theoretical and Applied Genetics*, 112, 977-983.
16. Ghanavati, F., Mozafari, J. & Kazempour, Sh. (2006). Familiar relationship between Lucerne genuse on Iran based on RAPD molecular marker. *Pajouhesh & Sazandegi*, 66, 2-12. (in Farsi)
17. Hieter, P. & Griffiths, T. (1999). Polyploidy more is more of less. *Science*, 285, 210- 211.
18. Huziwara, Y. (1962). Karyotype analysis in some genera of Composite. VIII. Further studies on the chromosome of aster. *American Journal of Botany*, 49, 116-119.
19. Kumari, G. & Bijoy, K. R. (2010). Karyotype studies in dominant species of *Aloe* from eastern India. *Caryologia*, 63(1), 41-49.
20. Levan, A., Fedga, K. & Sandberg, A. A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52, 201-220.
21. Li, Y., Wng, Y., Sun, X. & Han, J. (2009). Using microsattelite (SSR) and morphological markers to assess the genetic diversity of 12 alfalfa (*Medicago sativa* spp. *Falcata*) populations from Eurasia. *Biotechnology*, 8(10), 2102-2108.
22. Liliya, K. (2000). Organization of plant genetic resources in Bulgaria. *Acta Horticulturae*, 510, 247-259.
23. Manifesto, M. M., Schlatter, A.S., Hopp, H.E., Suarez, E. Y. & Dubcovky, J. (2001). Quantitative evaluation of genetic diversity germplasm using molecular markers. *Crop Science*, 41, 682-690.

24. Marvyan, S., Safarnejad, A. & Majd, A. (2002). Comparison of some Caryological traits of Lucerne cultivars. *Pajouhesh & Sazandegi*, 56, 57, 25-29.
25. Mortazavi, M. (2007). *Evaluation of genetic variation of Lucerne using morphological, cytogenetic and biochemical markers*. M.Sc. Thesis, Razi University, Kermanshah, Iran. (in Farsi)
26. Paknia, R. & Karimzadeh, G. (2011). Karyotypic Study and Chromosome Evolution in Some Iranian Local Onion Populations. *Journal of Plant Physiology and Breeding*, 1(1), 49-62.
27. Paszko, B. (2006). A critical review and a new proposal of karyotype asymmetry indices. *Plant Systematics and Evolution*, 258(1-2), 39-48.
28. Peng, L. Z., Gong, L. S. & Qingm, C. Y. (2007). A novel statistical method for assessing SSR variation in autotetraploid alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Genetics Molecular Biology*, 30, 385-391.
29. Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S. & Rafalski, A. (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, 2, 225-238.
30. Price, H. J., Chmber, K. L. & Bachmann, K. (1981). Geographic and ecological distribution of genome DNA content variation in *Microseris douglasii* (Asteraceae). *Botanical Gazette*, 142, 415-426.
31. Romero-Zarco, C. (1986). A new method for estimating karyotype asymmetry. *Taxonomy*, 35, 526-530.
32. Ronfort, J., Jenczewski, E., Bataillon, T. & Rousset, F. (1998). Analysis of population structure in autotetraploid species. *Genetics*, 150, 921-930.
33. Sandrine, F., Joëlle, R., Pierre, B., Philippe, B., Thierry, H., Christian, H. & Bernadette, J. (2008). Genetic diversity among alfalfa (*Medicago sativa*) cultivars coming from a breeding program, using SSR markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 111, 1420-1429.
34. Sharyat, A. (2001). *Study of genetic variability of annual Lucerne by cytogenetic, electrophoretic and morphological traits*. M.Sc. Thesis, Sistan and Balouchestan University, Iran. (in Farsi)
35. Stebbins, G. L. (1971). *Chromosomal Evolution in Higher Plants*. Edward Arnold, London, UK.
36. Surve-Iyer, R. S., Adams, G. C., Lezzon, A. F. & Jones, A. L. (1995). Isozyme detection and variation in *Ieucostoma* species from *prunus* and *malus*. *Mycologia*, 87, 471- 482.
37. Veronesi, F. Charles, B. & Huyghe, C. (2010). Alfalfa. *Springer Science*, 395-436.
38. Watanabe, K., Yahara, T., Denda, T. & Kosuge, K. (1999). Chromosomal evolution in the genus *Brachyscome* (Asteraceae, Astereae): Statistical tests regarding correlation between changes in karyotype and habit using phylogenetic information. *Journal of Plant Research*, 112(2), 145-61.