شناسایی نشانگرهای ISSR پیوسته با صفات مورفولوژیک در جمعیتهای یونجه زراعی (*Medicago sativa* L.)

بابک عبدالهی مندولکانی* و حیدر عزیزی

ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده کشاورزی، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی

تاریخ دریافت: ۹۰/۷/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۱/۴/۲۵

چکیده

به منظور شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات ارتفاع بوته، میزان کلروفیل، وزن تر کل، وزن خشک کل، وزن تر برگ، وزن خشک برگ، وزن تر ساقه، وزن خشک ساقه، تعداد برگ، تعداد ساقه، تعداد برگ به تعداد ساقه، وزن خشک برگ به وزن خشک ساقه و وزن خشک کل به وزن تر کل در جمعیتهای مختلف یونجه زراعی، از نشانگرهای ISSR (Inter simple sequence repeat) استفاده شد. ۱۶ آغازگر مورد استفاده، ۱۱۷ مکان در ۸۰ ژنوتیپ یونجه تولید کرد. میانگین تعداد مکانها ۷/۳ مکان برای هر آغازگر بود. میانگین میزان اطلاعات چند شکل (Polymorphism information content) (PIC) برای آغازگرها ۰/۷۷ و از ۰/۶۵ (UBC849) تا ۰/۹۳ (۴۴۳) متغیر بود. برای شناسایی نشانگرهای مثبت مرتبط با صفات مورفولوژیک، تجزیه رگرسیون گام به گام بین داده‌های ملکولی به عنوان متغیرهای مستقل و صفات مورفولوژیک به عنوان متغیرهای وابسته انجام گرفت. نشانگرهای مرتبط با صفات وزن خشک کل و وزن خشک برگ یکسان بودند. نشانگرهای مرتبط با صفات تعداد برگ و نسبت وزن خشک برگ به وزن خشک ساقه به ترتیب Kourda و UBC849 بودند. بیشترین تغییرات مربوط به صفت میزان کلروفیل (۸۲ درصد) توسط نشانگرهای A12، UBC812، UBC808، UBC849، ۴۲۵، ۴۵۶ و ۸۴۸ تبیین شد، در حالی که آغازگرهای ۴۲۵ و UBC808، ۱۵ درصد از تغییرات مربوط به صفت وزن تر برگ را تبیین کردند. اکثر آغازگرهای مورد استفاده روی صفات مورد مطالعه مؤثر بودند، بنابراین می‌توان از این آغازگرها همراه با اطلاعات صفات مورفولوژیک در اصلاح یونجه زراعی جهت شناسایی والدین مناسب برای تهیه جمعیتهای نقشه‌یابی و تولید ارقام هیبرید استفاده کرد.

واژه های کلیدی: یونجه، نشانگرهای مثبت، صفات مورفولوژیک

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۲۳۸۶۹۹۰ ، پست الکترونیکی: b.abdollahi@urmia.ac.ir

مقدمه

یونجه (*Medicago sativa* L.) به عنوان یک گیاه دائمی از خانواده لگومینوز، مهم ترین گیاه علوفه‌ای برای تغذیه دام است که پس از غلات، مهم ترین محصول اقتصادی در دنیا محسوب می‌شود. جنس *Medicago* دارای ۵۶ گونه بوده که ۲۲ گونه چندساله دگرگشن (از جمله گونه زراعی *M. sativa*) و ۳۴ گونه یکساله خودگشن می‌باشد. اکثر گونه-های چندساله تتراپلوئید (2n=4x=32) بوده ولی تعدادی از آنها دیپلوئید (2n=2x=16) می‌باشند (۱، ۹ و ۱۱).

با توجه به اینکه تنوع گیاهان زراعی همبستگی مثبتی با پراکندگی جغرافیایی آنها دارد و گیاهان زراعی طی سالها زیستن در شرایط محیطی متفاوت حاوی ژنهای متنوعی شده‌اند (۱۶) بنابراین تنوع ژنتیکی زیادی در گیاهان داخل یک توده یونجه که در اقلیمهای مختلف جغرافیایی رشد می‌کنند وجود دارد (۴ و ۱۱). وجود چنین اختلاف ژنتیکی گسترده در بین افراد جمعیت یونجه، مطالعات مربوط به ژنتیک جمعیت این محصول را پیچیده‌تر نموده است (۱۰، ۲۱ و ۲۳). امروزه برخی برنامه‌های اصلاح یونجه بر اساس

گزینش فنوتیپی و مورفولوژیکی استوار است. با توجه به محدود بودن تعداد نشانگرهای مورفولوژیکی و متأثر بودن آنها از عوامل محیطی، کاربرد اینگونه نشانگرها محدود است (۷ و ۲۶). نشانگرهای مولکولی بویژه نشانگرهای مبتنی بر DNA با ایجاد تعداد نامحدودی نشانگر و با حذف اثرهای ناشی از عوامل محیطی، توانسته است بسیاری از مشکلات مربوط به نشانگرهای مورفولوژیک را برطرف کند (۲۰ و ۲۱). از این رو، تعیین ارتباط بین نشانگرهای مولکولی و صفات مورفولوژیک، می‌تواند گامی مؤثر در استفاده از گزینش جمعیتی باشد. پیوستگی ژنتیکی بین نشانگرها و مکانهای ژنی صفات کمی، محتمل‌ترین توجیه برای وجود رابطه بین نشانگرهای مولکولی و نمود صفات کمی است (۲۴). استفاده از پیوستگی بین نشانگرهای مولکولی و ژنهای کنترل کننده صفات کمی، فرآیند اصلاح نباتات را تسریع کرده است به طوری که به جای ارزیابی صفات، گزینش غیرمستقیم به کمک نشانگرهای پیوسته صورت می‌گیرد. در بسیاری از مطالعات، نشانگرهای پیوسته با صفات که با استفاده از مطالعات مبتنی بر تجزیه پیوستگی در گذشته انجام گرفته است فاصله ژنتیکی زیادی را با صفات مورد مطالعه داشته و برای گزینش به کمک نشانگر و همسانه‌سازی بر اساس نقشه مفید نبودند. به علاوه در مطالعات مبتنی بر تجزیه پیوستگی، تعداد کمی از ژنوتیپها به عنوان والدین جمعیت در حال تفرق برای شناسایی چند شکلیهای مرتبط با صفات مورد مطالعه غربال می شوند که این خود محدودیت دیگری را ایجاد می‌کند، زیرا ممکن است نشانگرهای شناسایی شده در این والدین برای گزینش به کمک نشانگر در زمینه‌های ژنتیکی والدین و ارقام دیگر مفید نباشد. برای غلبه بر این محدودیتها در سالهای اخیر روش مکان یابی ارتباطی (Association mapping) یا تجزیه ارتباطی (Association analysis) معرفی شده است که نه تنها امکان مکان‌یابی دقیق ژنها را فراهم می‌کند، بلکه امکان شناسایی نواحی کروموزومی دیگری که در مطالعات مبتنی بر پیوستگی امکان پذیر نیستند را نیز میسر می‌سازد. کارآیی این روش در انسان نیز برای شناسایی و مکان‌یابی ژنهای کنترل کننده صفات مندلی نشان داده شده است. در علوم گیاهی نیز این روش رو به گسترش است (۲، ۳، ۱۳ و ۱۷). چنین بررسیهایی در ایران که به عنوان یکی از رستنگاههای اولیه یونجه منظور شده و توده‌های محلی متنوعی دارد مهم است (۷ و ۸). تجزیه ارتباط در خزانه ژنی سیب زمینی با ۶۰۰ رقم نشان داد که ارتباط معنی‌داری بین نشانگرهای PCR مبتنی بر ژن R1 (یک ژن عمده دخیل در مقاومت به بلایت دیررس سیب زمینی) و رسیدگی وجود دارد (۱۳). ایواندیک و همکاران (۱۴) با استفاده از ۳۳ نشانگر SSR و روش تجزیه ارتباط، نشانگرهای مرتبط با زمان گلدهی تحت رژیمهای مختلف رشدی را در جو شناسایی کردند. خدارحمی و همکاران (۱۸) با استفاده از روش تجزیه ارتباط، ۵ نشانگر SSR مرتبط با سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری (AUDPC) و ۴ نشانگر مرتبط با ضریب آلودگی نهایی را در گندم برای مقاومت به زنگ زرد معرفی کردند. با توجه به اینکه هنوز استفاده از تجزیه ارتباط در یونجه برای شناسایی نشانگرهای مثبت مرتبط با صفات مورفولوژیک گزارش نشده است، هدف از این آزمایش شناسایی نشانگرهای مثبت و آگاهی بخش مرتبط و پیوسته با صفات مورفولوژیک در یونجه با استفاده از نشانگرهای ISSR و رگرسیون گام به گام بود.

مواد و روشها

مواد گیاهی مورد مطالعه در این تحقیق شامل ۸۰ ژنوتیپ مربوط به ۸ جمعیت قره‌یونجه ملک‌کندی، قره‌یونجه ارومیه، محلی اصفهان، بغدادی، همدانی، آذربایجان اردوباد، الچی و ساکوئل (جدول ۱) بودند. جمعیتها در قالب طرح بلوکهای کامل تصادفی در ۳ تکرار روی خطوطی به طول یک متر کشت شده و صفات ارتفاع بوته (سانتیمتر)، میزان کلروفیل، وزن تر کل (گرم)، وزن خشک کل (گرم)، وزن

تر برگ (گرم)، وزن خشک برگ (گرم)، وزن تر ساقه (گرم)، وزن خشک ساقه (گرم)، تعداد برگ، تعداد ساقه، تعداد برگ به تعداد ساقه، وزن خشک برگ به وزن خشک ساقه و وزن خشک کل به وزن تر کل بر اساس ۵ نمونه در هر تکرار اندازه‌گیری و ثبت شدند.

جدول ۱- جمعیتهای یونجه مطالعه شده و منشأ آنها

جمعیت	منشأ	تعداد افراد مورد مطالعه از هر جمعیت
قره یونجه ملک کندی	ایران- خوی	۱۰
قره یونجه ارومیه	ایران- ارومیه	۱۰
محلی اصفهان	ایران- اصفهان	۱۰
بغدادی	ایران- کرمان	۱۰
همدانی	ایران- همدان	۱۰
آذربایجان اردوباد	آذربایجان	۱۰
الچی	ترکیه	۱۰
ساکوئل	ترکیه	۱۰

جدول ۲- توالی آغازگرهای ISSR استفاده شده، تعداد کل مکانهای تکثیر شده، محتوای اطلاعات چند شکل (PIC*) و دامنه اندازه باندی (جفت باز)

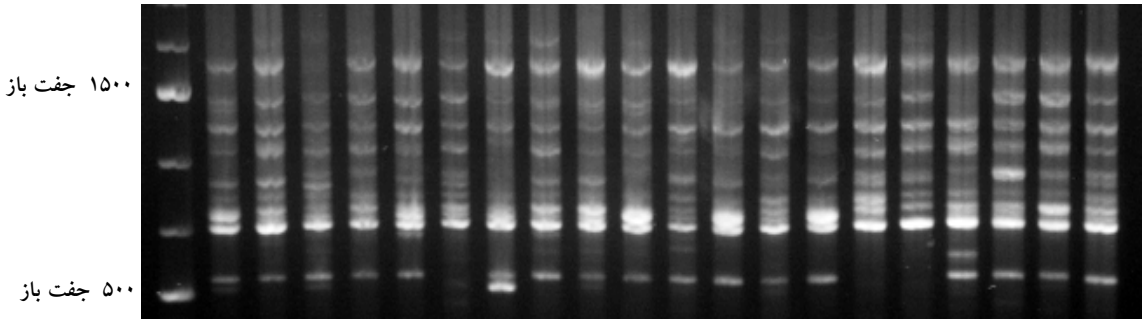
آغازگر	توالی آغازگر	تعداد مکان‌های تکثیر شده	تعداد مکان‌های چند شکل	PIC	دامنه اندازه باندی (جفت باز)
۴۲۵	$(CA)_{10}G$	۷	۶	۰/۸۵	۸۰۰-۳۰۰۰
۴۲۶	$(CAC)_7T$	۳	۰	۰/۸۱	۲۵۰-۲۵۰۰
۴۳۸	$(AC)_9G$	۵	۵	۰/۹۲	۸۰۰-۴۰۰۰
۴۴۰	$(AC)_9C$	۴	۳	۰/۸۸	۱۵۰۰-۳۰۰۰
۴۴۳	$(AC)_9T$	۳	۳	۰/۹۳	۱۵۰۰-۴۵۰۰
۴۵۶	$(ACC)_6C$	۷	۵	۰/۷۳	۸۰۰-۱۵۰۰
۴۵۹	$(TGC)_6C$	۳	۲	۰/۸۹	۸۰۰-۱۳۰۰
۸۲۵	$(AC)_7T$	۱۲	۱۱	۰/۷۴	۵۰۰-۲۵۰۰
۸۴۸	$(CA)_8G$	۱۰	۹	۰/۷۶	۱۵۰۰-۳۰۰۰
A7	$(AG)_{10}T$	۶	۲	۰/۶۹	۶۰۰-۲۲۰۰
A12	$(GA)_6CC$	۷	۴	۰/۷۷	۵۰۰-۲۵۰۰
A13	$(GT)_6CC$	۹	۶	۰/۶۶	۷۰۰-۲۰۰۰
B1	$(TC)_{10}C$	۱۰	۹	۰/۷۳	۱۳۰۰-۳۵۰۰
UBC808	$(CA)_7G$	۱۲	۱۰	۰/۷۲	۱۰۰۰-۳۰۰۰
UBC812	$(GA)_8A$	۱۰	۸	۰/۶۸	۶۰۰-۳۰۰۰
UBC849	$(GT)_8CG$	۹	۸	۰/۶۵	۶۰۰-۲۲۰۰
میانگین		۷/۳	۶/۰۷	۰/۷۷	-

*: Polymorphic information content

استخراج DNA ژنومی و تجزیه داده‌ها: بذور ابتدا در ظروف پتری جوانه‌دار شده و سپس به گلدان منتقل شدند. پس از رشد گیاهچه‌ها در گلخانه از هر جمعیت، ۱۰ نمونه به طور تصادفی انتخاب و از برگهای سالم و سبز هر گیاه نمونه برداری شد. استخراج DNA به روش CTAB (۱۲) با تغییرات جزئی انجام گرفت. کیفیت و کمیت DNA استخراجی با روش اسپکتروفوتومتری و الکتروفورز ژل آگارز تعیین و سپس به غلظت ۳۰ نانوگرم در میکرولیتر برای انجام واکنشهای PCR رقیق‌سازی شد. ۱۶ آغازگر ISSR انتخاب و مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۲). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در ترموسایکلر PerkinElmer– Applied Biosystems در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۴۵ نانوگرم DNA ژنومی، بافر PCR یک برابر (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8.3) ، ۱/۵ میلی‌مول $MgCl_2$، ۰/۲ میکرومول از هر dNTP، ۰/۵ واحد آنزیم تک پلیمراز و ۱۰ پیکومول از هر آغازگر انجام گرفت. چرخه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به صورت: ۴ دقیقه واسرشت سازی اولیه در ۹۴ درجه و ۳۵ چرخه شامل ۴۰ ثانیه در ۹۴ درجه (جهت واسرشت سازی)، ۴۰ ثانیه در ۵۴ درجه (جهت اتصال آغازگرها) و ۲ دقیقه در ۷۲ درجه (جهت بسط) و بسط نهایی در ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه بود. تفکیک محصولات تکثیری با استفاده از ژل آگارز ۱/۸ درصد Resolute^{Tm} line Biozyme(شرکت بیوزایم) و بافر TBE نیم برابر (0.5 X) با ولتاژ ۹۰ انجام شد و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید صورت گرفت. برای تعیین اندازه نوارها نیز از نشانگر اندازه O'GeneRuler^{TM} (شرکت فرمنتاس) استفاده شد (شکل ۱). پس از امتیازدهی الگوهای نواری به صورت یک و صفر و ارزیابی فنوتیپی صفات در مزرعه، برای شناسایی نشانگرهای مثبت مرتبط و پیوسته با صفات مورفولوژیک مورد مطالعه، تجزیه رگرسیون گام به گام با در نظر گرفتن مکانهای نشانگری به عنوان متغیرهای مستقل و صفات مورفولوژیک به عنوان متغیرهای وابسته انجام گرفت. تجزیه‌های آماری با استفاده از نرم‌افزارهای SPSS نسخه ۱۵ (۱۹) و Popgene نسخه ۱/۳۱ (۲۵) انجام گرفت.

جدول ۳- نتایج رگرسیون گام به گام بین صفات مورفولوژیک و داده های مولکولی برای شناسایی نشانگرهای مثبت در جمعیتهای یونجه مورد مطالعه

صفات گیاهی	مکان ژنی	R^2 تصحیح شده	سطح معنی داری
ارتفاع بوته	425, 456, 848, UBC812	۰/۴۳	۰/۰۴۱
میزان کلروفیل	UBC808, UBC849, UBC812, A12, 848, 425, 456	۰/۸۲	۰/۰۳۸
وزن تر کل	425, 848, UBC808, A13	۰/۴۱	۰/۱۳۴
وزن خشک کل	UBC812, UBC849, A13, 425	۰/۴۰	۰/۰۰۶
وزن تر برگ	425, UBC808	۰/۱۵	۰/۰۲۸
وزن خشک برگ	UBC812, UBC849, A13, 425	۰/۳۶	۰/۰۱۲
وزن تر ساقه	425, 848, 456, UBC808, A13	۰/۴۵	۰/۰۳۱
وزن خشک ساقه	425, 848, UBC808, A13	۰/۴۲	۰/۰۰۶
تعداد برگ	Kourda	۰/۱۹	۰/۱۱۲
تعداد ساقه	443, 440, 825, Kourda, UBC808, UBC812, A13	۰/۷۹	۰/۱۲۱
تعداد برگ به تعداد ساقه	438, 440, 825, UBC849	۰/۴۳	۰/۰۰۹
وزن خشک برگ به وزن خشک ساقه	UBC849	۰/۳۷	۰/۰۱۸
وزن خشک کل به وزن تر کل	825, Kourda, UBC849	۰/۴۴	۰/۰۴۲



شکل ۱ – الگوی باندی آغازگر UBC808 روی جمعیتهای محلی اصفهان (۱۰ فرد اول از سمت راست) و آذربایجان اردوباد (۱۰ فرد دوم از سمت راست)، نشانگر اندازه O'GeneRuler^{TM} (شرکت فرمنتاس) یک کیلوباز می‌باشد

نتایج و بحث

از ۱۶ آغازگر ISSR مورد استفاده، ۱۵ آغازگر الگوی باندی مشخص و چندشکل و یک آغازگر (۴۲۶) الگوی باندی مشخص ولی مونومورف تولید کردند (جدول ۲). ۱۱۷ مکان توسط ۱۶ آغازگر تکثیر شد که از این تعداد ۹۱ مکان چند شکل (۷۸ درصد) بودند. متوسط مکانهای چندشکل برای هر آغازگر ۶/۰۷ بود. چندشکلی بالای حاصل در پژوهش حاضر را می‌توان به کارآیی بالای روش ISSR، وسعت مناطق جغرافیایی نمونه برداری شده، هتروزیگوسیتی و دگرگشنی یونجه و به تعداد زیاد ژنوتیپهای مورد بررسی نسبت داد (۲۳ و ۲۶). همچنین از آنجایی که در روش ISSR، آغازگرها مکمل نواحی ریز ماهواره‌ای می‌باشند که در یوکاریوت‌ها با فراوانی بالا در سراسر ژنوم پراکنده‌اند بنابراین استفاده از این روش می تواند سطح بالایی از چندشکلی را آشکار سازد (۵ و ۲۷). جبارزاده و همکاران (۲۰۱۰) نیز در مطالعه گونه‌های مختلف رز، چندشکلی بالای نشانگرهای ISSR را گزارش نمودند (۱۵). لی و همکاران (۲۰۰۸) در مطالعه برخی والدین سیب زمینی شیرین در چین گزارش نمودند که نشانگرهای ISSR قادرند نمونه‌های مورد مطالعه را با کارآیی بالایی از همدیگر متمایز سازند (۲۰). تعداد مکانها از سه برای آغازگرهای ۴۴۳ و ۴۵۹ تا ۱۲ برای آغازگرهای ۸۲۵ و UBC808 متغیر بود. میانگین تعداد مکانها برای آغازگرهای مورد استفاده، ۷/۶ مکان به ازای هر آغازگر بود. دامنه اندازه مکانها از ۵۰۰ (آغازگرهای ۸۲۵ و A12) تا ۴۵۰۰ جفت باز (آغازگر ۴۴۳) متغیر بود. میزان اطلاعات چند شکل (PIC) از ۰/۶۵ تا ۰/۹۳ به ترتیب برای آغازگرهای UBC849 و ۴۴۳ متغیر بود. میانگین PIC برای مکانهای مورد مطالعه ۰/۷۷ بود (جدول ۲) که بیانگر کارآیی نشانگرهای ISSR در تمایز جمعیتهای یونجه می باشد. همچنین تعداد زیاد مکانهای تکثیر شده در این آزمایش نشان می‌دهد که تعداد کمی از آغازگرهای ISSR با میزان اطلاعات چندشکل بالا، می‌تواند تعداد زیادی نمونه و جمعیتهای مختلف یونجه را تفکیک کند. قبلا نیز تحقیقات مختلفی کارایی بالای نشانگرهای ISSR را در مطالعات مرتبط با تعیین تنوع ژنتیکی و روابط تکاملی در گونه‌های گیاهی مختلف نشان داده است (۴، ۱۵ و ۲۰). شکل یک الگوی باندی آغازگر UBC808 را روی جمعیتهای محلی اصفهان و آذربایجان اردوباد نشان می دهد.

به منظور تعیین ارتباط بین صفات یادداشت شده و داده-های مولکولی و شناسایی نشانگرهایی که بالقوه قابلیت پیوستگی با این صفات را دارند از روش رگرسیون گام به گام استفاده شد. نتایج نشان داد که مکانهای تکثیری توسط آغازگر ۴۲۵ با بیشترین تعداد صفت مرتبط است (جدول ۳). این آغازگر ۷ مکان را در جمعیتهای مورد مطالعه نشان داد. کمترین تعداد نشانگر موثر برای صفات تعداد برگ

(آغازگر Kourda) و وزن خشک برگ به وزن خشک ساقه (UBC849) شناسایی شد. محمدی و همکاران (۱۳۸۹) کمترین تعداد نشانگر SSR مؤثر (یک نشانگر) را برای صفت وزن خشک برگ در یونجه گزارش نمودند (۸). آغازگر ۴۴۰ با تغییرات دو صفت تعداد ساقه و نسبت تعداد برگ به تعداد ساقه ارتباط داشت. این آغازگر ۴ مکان را در جمعیتهای مورد مطالعه نشان داد. نشانگرهای مرتبط با دو صفت وزن خشک کل و وزن خشک برگ یکسان بودند (UBC812، UBC849، A13 و ۴۲۵). محمدی و همکاران (۱۳۸۹) همبستگی مثبت و معنی داری را بین این دو صفت گزارش نمودند (۸). شناسایی نشانگرهای مشترک برای برخی صفات در این آزمایش می‌تواند ناشی از اثرات پلیوتروپی و یا پیوستگی مکانهای مربوطه باشد (۳، ۶ و ۱۷). بیشترین تعداد نشانگر مثبت برای صفات میزان کلروفیل و تعداد ساقه شناسایی شد تعدادی از نشانگرهای مؤثر در این دو صفت نیز یکسان بود. بیشترین تغییرات مربوط به صفت میزان کلروفیل (۸۲ درصد) توسط آغازگرهای ۴۲۵، ۴۵۶، ۸۴۸، A12، UBC808، UBC812 و UBC849 تبیین شد، در حالی که آغازگرهای ۴۲۵ و UBC808 فقط ۱۵ درصد از تغییرات مربوط به صفت وزن تر برگ را تبیین کردند. عزیزی و همکاران (۱۳۹۰) با استفاده از تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) و تجزیه کلاستر گزارش نمودند که نشانگرهای تولیدی توسط آغازگرهای ISSR مورد استفاده در این مطالعه همبستگی کمتری با همدیگر دارند و قادرند جمعیت‌های مختلف یونجه را متمایز سازند (۴). بنابراین می‌توان گفت نشانگرهای مورد بررسی توزیع یکنواختی در ژنوم یونجه‌های زراعی مورد مطالعه دارند و شاید این مورد دلیلی بر پیوستگی تعداد بیشتری از نشانگرهای ISSR تولیدی در این مطالعه با صفات زراعی مورد مطالعه باشد. توالی‌یابی نشانگرهای تولیدی توسط آغازگرهای دارای R^2 بالا و مقایسه آنها با توالیهای موجود در بانکهای اطلاعاتی به اطمینان استفاده از آنها در برنامه‌های انتخاب به کمک نشانگر و همسانه‌سازی ژن بر اساس نقشه می‌افزاید. محمدی و همکاران (۱۳۸۹) با استفاده از نشانگرهای SSR و رگرسیون گام به گام ۱۷ نشانگر را در یونجه شناسایی نمودند که رابطه معنی‌داری با حداقل یکی از ۱۱ صفت مورفولوژیک مطالعه شده نشان دادند (۸). رشیدی و همکاران (۱۳۸۷) با استفاده از نشانگرهای SSAP، ۳۲ نشانگر را در گندم شناسایی نمودند که حداقل با یکی از صفات زراعی مورد بررسی رابطه معنی‌داری داشت (۲). اسکات و همکاران (۲۰۰۵) از نشانگرهای AFLP برای شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات مهم زراعی در چاودار استفاده کردند. آنها ۳ نشانگر پیوسته با صفت تاریخ خوشه‌دهی را شناسایی نمودند که با مکانهای کنترل کننده این صفت در کروموزوم ۷ پیوستگی نشان دادند و گزارش نمودند که نشانگرهای AFLP و رگرسیون گام به گام برای شناسایی نشانگرهای آگاهی بخش برای صفات زراعی مفید می‌باشند (۲۲). عبدالهی مندولکانی و همکاران (۱۳۸۹) برای شناسایی نشانگرهای مثبت مرتبط با صفات مورفولوژیک در بادام زمینی از تجزیه ارتباط با استفاده از نشانگرهای SSR استفاده نمودند و بیان کردند که این روش برای شناسایی مکانهای آگاهی بخش مرتبط با صفات مورفولوژیک مفید و مطمئن بوده و نشانگرهای مؤثر حاصل از این مطالعات می‌تواند در برنامه‌های گزینش به کمک نشانگر و تهیه جمعیتهای نقشه‌یابی استفاده شوند (۳). نتایج مطالعه حاضر و تحقیقات یاد شده نشان می‌دهد که چنانچه از آغازگرهای بیشتری استفاده شود می‌توان به شناسایی نشانگرهایی که دارای همبستگی بالا با صفات مرتبط با عملکرد و اجزای عملکرد باشند امید داشت و از آنها در پژوهشهای دیگر استفاده نمود. البته لازم است نشانگرهای شناسایی شده در چنین مطالعاتی در جمعیتهای بزرگ و همچنین در جمعیتهای در حال تفرق مورد آزمون قرار گیرد تا از پیوستگی آنها با صفات مربوطه اطمینان به عمل آید و بدین ترتیب کارآیی استفاده از این نشانگرها در برنامه‌های اصلاحی افزایش یابد. همچنین با توجه به اینکه

اکثر نشانگرهای تولیدی توسط آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق بر روی صفات مورد مطالعه مؤثر بودند بنابراین احتمال دارد بتوان از این آغازگرهای ISSR در برنامه‌های اصلاحی یونجه برای شناسایی والدین مناسب برای تهیه جمعیتهای نقشه‌یابی و تولید ارقام هیبرید استفاده کرد.

منابع

۱. بهار، م.، قبادی، س.، عرفانی مقدم، و.، یامچی، ا.، طالبی بداف، م.، کابلی، م. م. و مختارزاده، ع. ا. (۱۳۸۵). ارزیابی تنوع ژنتیکی جمعیتهای بومی یونجه ایران با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره ESTs. مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی، ۲: ۱۴۱-۱۵۳.

۲. رشیدی منفرد، س.، مردی، م.، حسین‌زاده، ع.، نقوی، م. (۱۳۸۷). تجزیه ارتباطی بین صفات زراعی مهم و نشانگرهای رتروترانسپوزونی SSAP در نمونه‌های گندم دوروم. مجله ژنتیک نوین، ۳ (۲): ۲۹-۳۶.

۳. عبدالهی مندولکانی، ب.، اعلمی، ع.، اصفهانی، م. (۱۳۸۹). تجزیه ارتباط برای صفات مورفولوژیک در بادام زمینی (*Arachis hypogea* L.) با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره. مجله علوم زراعی ایران، ۱۲(۴):۵۱۰-۵۱۹.

۴. عزیزی، ح.، برنوسی، ا.، عبدالهی مندولکانی، ب.، درویش زاده، ر. (۱۳۹۰). مطالعه ساختار و تنوع ژنتیکی جمعیت‌های یونجه زراعی (*Medicago sativa* L.) با استفاده از نشانگرهای ISSR. مجله ژنتیک نوین، ۶ (۴): ۶۱-۶۹.

۵. فابریکی اورنگ، ص.، شمس بخش، م.، جلالی جواران، م.، احمدی، ج. (۱۳۸۸). بررسی تنوع ژنتیکی توده‌های بومی خربزه ایرانی (*Cucumis melo* L.) با استفاده از نشانگرهای ملکولی بین ریزماهواره‌ای (ISSR). مجله زیست شناسی ایران، ۲۲ (۲): ۲۷۱-۲۸۱.

۶. فتوکیان، م. ح.، ناجی، ا. م.، احمدی، ج.، امیری اوغان، ح.، سادات نوری، س. ا.، محمدی نژاد، ق.، محدثی، ع.، آگاهی، ک. (۱۳۸۹). شناسایی مکان‌های ژنی ارتفاع بوته، تعداد پنجه، طول و عرض برگ پرچم در برنج با استفاده از نشانگرهای میکروستلایت. مجله زیست شناسی ایران، ۲۳ (۴): ۴۸۸-۴۹۷.

۷. فرشادفر، م.، فارغی، ش.، فرشادفر، ع.، جعفری، ع. ا. (۱۳۸۷). ارزیابی تنوع ژنتیکی یونجه با استفاده از شاخص‌های ریخت شناسی و شیمیایی. فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، ۱۶: ۱-۱۳.

۸. محمدی، ر.، نقوی، م. ر.، معالی امیری، ر.، رضایی، م. (۱۳۸۹). شناسایی نشانگرهای آگاهی بخش ریزماهواره در بخشی از یونجه‌های زراعی (*Medicago sativa* L.) ایران. مجله ژنتیک نوین، ۵ (۲): ۵۷-۶۶.

9. Barcaccia, G., Albertin, E., Tavoletti, S., Falcinelli, M. And Veronesi, F. (1999). AFLP fingerprinting in *Medicago* spp: its development and application in linkage mapping. Plant Breeding, 118: 335-341.

10. Barcaccia, G., Tosti, N., Falistocco, E. And Veronesi, F. (1995) Cytological, morphological and molecular analysis of controlled progenies from meiotic mutants of alfalfa producing unreduced gametes. Theoretical and Applied Genetics, 91: 1008-1015.

11. Diwan, N., Bhagwat, A.A., Bauchan, G.B. And Cregan, P.B. (1997) Simple sequence repeat DNA markers in alfalfa and perennial and annual medicago species. Genome, 40: 887-895.

12. Doyle, J.J. And Doyle, J.L. (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 12: 13-15.

13. Gebhardt, C., Ballvora, A., Walkemeier, B., Oberhagemann, P. And Schuler, K. (2004) Assessing genetic potential in germplasm collections of crop plants by marker-trait association: a case study for potatoes with quantitative variation of resistance to late blight and maturity type. Molecular Breeding, 13: 93–102.

14. Ivandic, V., Hackett, C.A., Nevo, E., Keith, R., Thomas, W.T.B. And Forster, B.P. (2002) Analysis of simple sequence repeats (SSRs) in wild barley from the Fertile Crescent: associations with ecology, geography and

سپاسگزاری

بدین وسیله نگارندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه و پژوهشکده بیوتکنولوژی دانشگاه ارومیه که امکانات لازم را برای انجام این تحقیق فراهم نمودند، اعلام می‌نمایند.

flowering time. Plant Molecular Biology, 48: 511–527.

15. Jabbarzadeh, Z., khosh-khui, M., Salehi, H. And Saberivand, A. (2010) Inter simple sequence repeat (ISSR) markers as reproducible and specific tools for genetic analysis of rose species. African Journal of Biotechnology, 37: 6091-6095.

16. Julier, B., Huyghe, C.H. And Ecall, C.H. (2000) Within and among cultivar genetic variation in alfalfa: forage quality, morphology and yield. Crop Science, 4:362-365.

17. Jun, T.H., Van, K., Kim, M.Y., Lee, S.H. And Walker, D.R. (2008) Association analysis using SSR markers to find QTL for seed protein content in soybean. Euphytica, 62: 179–191.

18. Khodarahmi, M., Mohammadi, S.A. And Jalal-kamali, M.R. (2009) Identification of informative marker for yellow rust resistant related cultivars. The 6th national biotechnology congress of Iran. 13-15 Aug, Milad tower conference hall, Tehran, Iran.

19. Levesque, R. (2007) SPSS programming and data management: A guide for SPSS and SAS Users, Fourth Edition. SPSS Inc. Chicago.

20. Li, Q., Liu, Q.C., Zhai, H., Ma, D.F., Wang, X., Li, X.Q. And Wang, Y.P. (2008) Genetic diversity in main parents of sweet potato in china as revealed by ISSR Markers. Acta Agronomica Sinicia, 34 (6): 972-977.

21. Mengoni, A., Gori, A. And Bazzicalupo, M. (2000) Use of RAPD and microsatellite (SSR) variation to assess genetic relationships among populations of tetraploid alfalfa, *Medicago sativa*. Plant Breeding, 119: 113-117.

22. Skot, L., Humphreys, M.O., Armstead, I.P., Heywood, S., Skot, K.P., Sanderson, R., Thomas, I.D., Chorlton, K.H. And Sackville-Hamilton, N.R. (2005) An association mapping approach to identify flowering time genes in natural populations of *Lolium perenne* L. Molecular Breeding, 15: 233-245.

23. Veronesi, F., Charles, B. And Huyghe, C. (2010) Alfalfa. Springer Sci. 395-436.

24. Virk, P.S., Ford-Lioyd, B.V., Jackson, M.T., Pooni, H.S., Clemeno, T.P. And Newbury, H.J. (1996) Marker-assisted prediction of agronomic traits using diverse rice germplasm. Third International Rice Genetics Symposium, Manilla, Philippines. 307-316.

25. Yeh, F.C., Boyle, T., Rongcai, Y., Ye, Z. And Xian, J.M. (1999) POPGENE version 3.1. http://www.ualberta.ca/- fyeh/fyeh.

26. Zaccardelli, M., Gnocchi, S., Carelli, M. And Scotti, C. (2003) Variation among and within Italian alfalfa ecotypes by means of bio-agronomic characters and amplified fragment length polymorphism analyses. Plant Breeding, 122: 61-65.

27. Zietkiewicz, E., Rafalski, A., Labuda, D. (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase reaction amplification. Genomics, 20:176-183.

Identification of ISSR markers associated with morphological traits in cultivated alfalfa (*Medicago sativa* L.) populations

Abdollahi Mandoulakani B. and Azizi H.

Plant Breeding and Biotechnology Dept., Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, I.R. of Iran

Abstract

ISSR markers were used to identify informative markers associated with traits plant high, chlorophyll content, total wet weight, total dry weight, leaf wet weight, leaf dry weight, stem wet weight, stem dry weight, number of leaves, number of stems and their ratio, ratio of leaf dry weight to stem dry weight and total dry weight to total wet weight in alfalfa populations. Sixteen ISSR primers amplified 117 loci among 80 alfalfa genotypes, with an average of 7.3 loci per primer. Polymorphic information content (PIC) ranged from 0.65 (UBC849) to 0.93 (443), with an average of 0.77. Stepwise regression analysis between molecular data as independent variables, and morphological data as dependent variables was performed to identify informative markers associated with the studied traits. ISSR loci associated with total dry weight and leaf dry weight were the same. ISSR markers, Kourda and UBC849, were associated with number of leaves and leaf dry weight to stem dry weight, respectively. The maximum variation of chlorophyll content (82%) was accounted by UBC808, UBC812, UBC849, A12, 848, 425 and 456 markers while UBC808 and 425 markers accounted for 15% of the variation of the leaf wet weight. Since most of the used ISSR primers showed significant association with the studied traits, therefore, it is possible to use these markers along with morphological traits in alfalfa breeding programs for identification of suitable parents to produce mapping populations and hybrid varieties.

Key words: Alfalfa, Informative markers, Morphological traits