دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

تجزیه ارتباط صفات مورفولوژیک در یونجه زراعی با استفاده از نشانگرهای ملکولی

بابک عبدالهی مندولکانی[۱]، حیدر عزیزی[۲]، یاسر پیری[۳]، ساسان رحمانپور[۴] و لیلا حسنی[۴]

۱- دانشیار، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، (نویسنده مسوول: b.abdollahi@urmia.ac.ir)
۲- دانشجوی دکتری، دانشگاه گیلان
۳- دانشجوی دکتری، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری
۴- دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه ارومیه

تاریخ دریافت: ۹۳/۶/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۲

چکیده

در این مطالعه به‌منظور شناسایی نشانگرهای ملکولی مرتبط با ۱۳ صفت مورفولوژیک در یونجه زراعی (*Medicago sativa* L.) از ۱۰ آغازگر IRAP، ۱٤ آغازگر REMAP، ۱٦ آغازگر ISSR و ۷ جفت آغازگر SSR و تجزیه ارتباط به روش Mixed linear model (MLM) استفاده شد. صفات مورفولوژیک مورد مطالعه شامل ارتفاع، میزان کلروفیل، وزن‌تر کل، وزن خشک کل، وزن‌تر برگ، وزن خشک برگ، وزن‌تر 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 وزن‌تر کل بود. مطالعه ساختار جمعیت به‌عنوان پیش‌نیازی برای انجام تجزیه ارتباط نشان داد که ٦ زیرگروه احتمالی (K=٦) در جمعیت مورد مطالعه وجود دارد. در تجزیه ارتباط به روش MLM، ۹۵ مکان مرتبط (P≤0.02) با صفات مورد مطالعه شناسایی شد. ٥٤ درصد مکان‌ها مبتنی بر نشانگرهای رتروترنسپوزونی (IRAP و REMAP) و ٤٦ درصد مکان‌های شناسایی‌شده مبتنی بر نشانگرهای ISSR و SSR بود. نشانگر ISSR14-4 با ۸ صفت مرتبط بود. صفت وزن‌تر ساقه بیشترین تعداد نشانگر مرتبط (۱۳ مکان) را به خود اختصاص داد. نشانگرهای مرتبط با وزن خشک ساقه و وزن‌تر ساقه بیشترین ارتباط را با سایر صفات دارا بودند. نتایج به‌دست‌آمده از این مطالعه اطلاعات ارزشمندی درزمینه‌ی مبنای ژنتیکی صفات مورد مطالعه ارائه داد که از این اطلاعات می‌توان در برنامه‌های اصلاحی و تولید ارقام با میزان زیست توده بالا در یونجه استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: تجزیه ارتباط، صفات مورفولوژیک، نشانگرهای مولکولی، یونجه زراعی (*Medicago sativa* L.)، روش MLM

مقدمه

یونجه (Medicago sp.) گیاهی دائم یاز خانواده لگومینوزه بوده و مهم‌ترین گیاه علوفه‌ای در صنعت دامپروری محسوب می‌شود. همزیستی این گیاه با باکتری‌های ریزوبیوم و تثبیت نیتروژن مولکولی در آن باعث اهمیت آن درکشت متناوب و کشاورزی پایدار شده است. جنس Medicago شامل ۵۶ گونه است که ۲۲ گونه آن مانند *M. sativa* چندساله و دگرگشن بوده و ۳۴ گونه دیگر یک‌ساله و خودگشن می‌باشند. اکثر گونه‌های چندساله (مانند *M. sativa*) تتراپلوئید (2n=2x=32) بوده و برخی نیز دیپلوئید (2n=2x=16) هستند (۸). گونه‌های تتراپلوئید آلوگام بوده و به دلیل خود ناسازگاری تنها ۵۰-۲۰ درصد خودگشنی دارند (۲۵). منشأ و مرکز اولیه تنوع گیاه یونجه منطقه قفقاز شامل شمال شرق ترکیه، ترکمنستان و شمال غرب ایران است (۲۶) البته گونه‌های مختلفی از جنس Medicago در ایران شناسایی شده‌اند که به دلیل عدم توجیه اقتصادی و یک‌ساله بودن مورد توجه قرار نگرفته‌اند (۲۵). درتوده‌های یونجه به دلیل دگرگشنی زیاد و رشد در اقلیم‌های مختلف جغرافیایی تنوع ژنتیکی بالایی ایجاد شده است (۳۴،۱۳). نشانگرهای مولکولی از ابزارهای سودمند و پرکاربرد درزمینه‌ی بررسی تنوع ژنتیکی، مطالعه مبنای ژنتیکی صفات و شناسایی مکان‌های ژنومی پیوسته با صفات در گیاهان می‌باشند. در گیاه یونجه نیز به‌عنوان یک گیاه علوفه‌ای مهم و اقتصادی، پژوهش‌های زیادی درزمینه‌ی بررسی تنوع ژنتیکی و شناسایی نواحی ژنومی دخیل در صفات مهم با استفاده از نشانگرهای مولکولی صورت گرفته است (۵،۶،۲۸،۳۰) با تلفیق داده‌های حاصل از نشانگرهای مولکولی با داده‌های فنوتیپی حاصل از بررسی صفات زراعی، فیزیولوژیکی و مورفولوژیک و نیز مقاومت به بیماری‌ها و آفات مختلف می‌توان اطلاعات دقیقی در زمینه مبنای ژنتیکی صفات به دست آورد و همچنین نشانگرهای مرتبط با این صفات را شناسایی نمود. این نوع مطالعات تحت عنوان مطالعات مبتنی بر تجزیه پیوستگی (Linkage-based analysis) مطرح می‌باشد. در این مطالعات تعداد کمی از ژنوتیپ‌ها به‌عنوان والدین جمعیت در حال تفرق برای شناسایی چندشکلی‌های مرتبط با صفات مورد مطالعه بکار می‌رود که این مسئله باعث بروز محدودیت در شناسایی تعداد نشانگرهای مرتبط می‌شود. همچنین به‌واسطه نیاز به زمان طولانی برای تولید جمعیت‌های در حال تفرق در گیاهان چندساله و به‌ویژه درختان میوه و حساسیت برخی از گونه‌ها به خویش‌آمیزی در راستای ایجاد این جمعیت‌ها، کاربرد این روش مشکل‌ساز می‌باشد. امروزه برای غلبه بر این مشکلات از روش تجزیه یا مکان‌یابی ارتباطی (Association mapping) به‌عنوان روشی تلفیقی استفاده می‌شود. در این روش نیازی به تهیه جمعیت در حال تفرق وجود ندارد و از جمعیت‌های متنوع موجود جهت شناسایی مکان‌های ژنومی پیوسته با صفات استفاده می‌شود. بنابراین امکان شناسایی تمامی آلل‌های پیوسته با صفت مورد مطالعه وجود دارد. برخلاف تجزیه پیوستگی، در این روش ارتباط بین ژنوتیپ و فنوتیپ افراد مستقیماً برای شناسایی نواحی کروموزومی دخیل

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1395.8.19.8.3]

در کنترل صفت بررسی می‌شود(۳۳،۳۱). علی‌رغم اهمیت اقتصادی یونجه، درزمینه‌ی شناسایی نشانگرهای مولکولی و مکان‌های ژنتیکی مرتبط با صفات مورفولوژیک در این گیاه تحقیقات زیادی صورت نگرفته و تنها می‌توان به مکان‌یابی ژنتیکی صفات تحمل سرما، رشد پاییزی و آسیب‌های ناشی از یخ‌زدگی (۱۱)، تولید زیست‌توده (Biomass) (۳۰) و نقشه‌یابی QTLهای مرتبط باتحمل به آلومینیم، ماندگاری و مقاومت به بیماری‌ها اشاره نمود (۲۳). گسترش روش‌های مبتنی بر مکان‌یابی ارتباطی به‌ویژه روش Genome Wide Association Mapping در گیاهان موجب شناسایی کارای ژن‌های مسبب صفات زراعی در گیاهان مختلف شده است (۲۴،۲۰) در یونجه نیز ریزآرایه‌های SNP طراحی و در بررسی الگوهای تکاملی ساختار جمعیت و عدم تعادل لینکاژی که پیشنیاز انجام تجزیه ارتباط می‌باشد مورد استفاده قرارگرفته‌اند (۲۳). با توجه به اینکه تاکنون از تجزیه ارتباط برای شناسایی نشانگرهای ملکولی مرتبط با صفات مورفولوژیک استفاده نشده است هدف از مطالعه حاضر شناسایی مکان‌های ژنومی مرتبط با صفات زراعی و مرفولوژیک در یونجه با استفاده از نشانگرهای IRAP، REMAP، ISSR و SSR بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و ارزیابی صفات مورفولوژیک: در این مطالعه ۸۰ فرد متعلق به ۸ جمعیت یونجه زراعی (جدول ۱) بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه در ۳ تکرار کشت و ۱۳ صفت مورفولوژیک و زراعی یادداشت گردید. از هر جمعیت ۱۰ فرد به‌طورتصادفی انتخاب شد (۲۰) و سعی شد تا افراد انتخاب‌شده نمایانگر تنوع موجود در جمعیت منشأ باشند. صفات مورد مطالعه شامل ارتفاع (سانتی‌متر)، میزان کلروفیل، وزن‌تر کل (گرم)، وزن خشک کل (گرم)، وزن‌تر برگ (گرم)، وزن خشک برگ (گرم)، وزن‌تر 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 وزن‌تر کل بود. تمام اندازه‌گیری‌ها در مرحله رسیدن به ۱۰ درصد گل‌دهی انجام شد (۴).

جدول ۱- منشأ جمعیت‌های یونجه مورد استفاده در این تحقیق

Table 1. Origin of the alfalfa populations used in the current study

Origin	منشأ	Population	جمعیت
Iran-Khoy	ایران- خوی	Garayonjeh Malekkandi	قره‌یونجه ملک‌کندی
Iran-Urmia	ایران- ارومیه	Garayonjeh Urmia	قره‌یونجه ارومیه
Iran-Esfahan	ایران- اصفهان	Mahali Esfahan	محلی اصفهان
Iran-Kerman	ایران- کرمان	Baghdadi	بغدادی
Iran-Hamadan	ایران- همدان	Hamadani	همدانی
Azerbaijan	آذربایجان	Azerbaijan Ordoubad	آذربایجان اردوباد
Turkey	ترکیه	Elchi	الچی
Turkey	ترکیه	Sakuel	ساکوئل

ارزیابی مولکولی:DNA ژنومی افراد به روش CTAB (۱۵) استخراج شد. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز یک درصد و اسپکتوفتومتری ارزیابی شد. برای ثبت ژنوتیپ در افراد مورد مطالعه از ۱۰ آغازگر IRAP، ۱۴ آغازگر REMAP (۳)، ۱۶ آغازگر ISSR (۵) و ۷ جفت آغازگر SSR (۲) استفاده شد. واکنش‌های PCR و چرخه دمایی آن برای نشانگرهای IRAP و REMAP به روش عبدالهی مندولکانی و همکاران (۳)، برای نشانگرهای ISSR به روش عزیزی و همکاران (۵) و برای نشانگرهای SSR طبق روش عبدالهی مندولکانی و همکاران (۲) انجام گرفت. تفکیک محصولات تکثیری برای نشانگرهای IRAP، REMAP و ISSR با استفاده از ژل آگارز (Resolute^{Tm} line Biozyme) ۱/۸ درصد و برای نشانگرهای SSR با ژل آگارز ۳ درصد و بافر TBE نیم برابر با ولتاژ ۹۰ انجام شد و رنگ‌آمیزی با اتیدیم برماید صورت گرفت. برای تعیین اندازه باندها نیز از نشانگر اندازه O'GeneRuler^{TM} (شرکت فرمنتاس) استفاده شد.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1395.8.19.8.3]

جدول ۲- لیست و کد آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق

Table 2. List and code of the primers used in the current study

کد آغازگر Primer code	آغازگر Primer	کد آغازگر Primer code	آغازگر Primer	کد آغازگر Primer code	آغازگر Primer	کد آغازگر Primer code	آغازگر Primer
SSR1	AFca11	[b]IR1	Tms1Ret1	[a]RE1	Tms1Ret1-459	ISSR1	425
SSR2	AFctt1	IR2	LORE1	RE2	Tms1Ret1-A7	ISSR2	426
SSR3	AFat15	IR3	LORE2	RE3	Tms1Ret1-A12	ISSR3	438
SSR4	AFct60	IR4	Tps12a	RE4	Tms1Ret1-B1	ISSR4	440
SSR5	AFca1	IR5	Tms1Ret1- LORE1	RE5	Tms1Ret1-438	ISSR5	443
SSR6	B14B03	IR6	Tms1Ret1- LORE2	RE6	Tms1Ret1-443	ISSR6	456
SSR7	MTLEC2A	IR7	Tms1Ret1- Tps12a	RE7	Tms1Ret1-818	ISSR7	459
		IR8	LORE1-LORE2	RE8	Tms1Ret1-825	ISSR8	825
		IR9	LORE1-Tps12a	RE9	LORE1-840	ISSR9	848
		IR10	LORE2-Tps12a	RE10	LORE1-848	ISSR10	A7
				RE11	LORE2-849	ISSR11	A12
				RE12	LORE2-857	ISSR12	A13
				RE13	Tps12a-459	ISSR13	Kourda
				RE14	Tps12a-438	ISSR14	UBC808
						ISSR15	UBC812
						ISSR16	UBC849

a: RE=REMAP, b: IR=IRAP

تجزیه و تحلیل داده‌ها: باندهای حاصل از همه نشانگرها به‌صورت یک (حضور) و صفر (عدم حضور) امتیازدهی و ماتریس حاصل برای بررسی ساختار جمعیت استفاده شد. برای گروه‌بندی افراد تجزیه کلاستر به روش Neighbor Joining با استفاده از نرم‌افزار TASSEL3 (۱۰) انجام گرفت. ساختار جمعیت بر اساس داده‌های حاصل از تلفیق نشانگرها با استفاده از نرم‌افزار STRUCTURE 2.3.4 (۳۰) در حالت Admixture با ۱۰۰۰۰ بار Burn-in و ۵۰۰۰۰ بار تکرار MCMC در مقادیر مختلف K از ۱ تا ۲۰ (۱۰ تکرار برای هر K) بررسی شد. ماتریس سهم عضویت افراد (Q) که نشان‌دهنده میزان تعلق هر فرد به کلاسترها می‌باشد و همچنین میانگین شاخص تثبیت (F_{ST}) برای زیرگروه‌های احتمالی نیز با استفاده از همین نرم‌افزار برآورد گردید. عدد K بهینه (تعداد زیر جمعیت‌های احتمالی) بر اساس روش delta K (۱۷) با استفاده از نرم‌افزار STRUCTURE HARVESTER (۱۶) تعیین گردید. ماتریس روابط خویشاوندی افراد (ماتریس Kinship) و تجزیه ارتباط به روش MLM با نرم‌افزار TASSEL 3 انجام گرفت (۱۰). نشانگرهای مرتبط با صفات مورد مطالعه با توجه به مقادیر P-value کمتر از ۰/۰۲ انتخاب شدند.

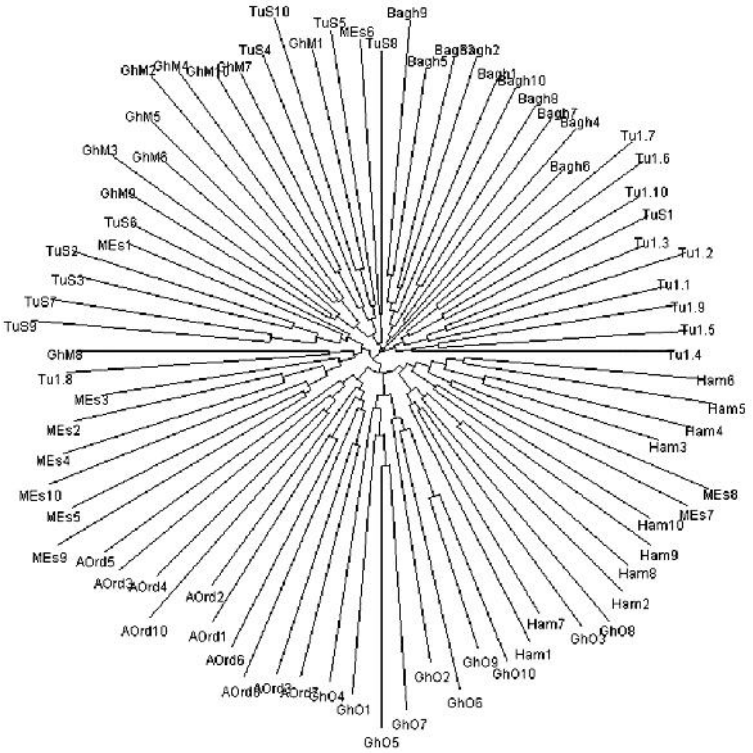
نتایج و بحث

بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت

با توجه به اینکه در تجزیه ارتباط و شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات، بررسی ساختار جمعیت ضروری می‌نماید بنابراین ابتدا ساختار جمعیت موردمطالعه با استفاده از ۱۰ آغازگر IRAP، ۱۴ آغازگر REMAP، ۱۶ آغازگر ISSR و ۷ جفت آغازگر SSR (جدول ۲) مورد بررسی قرار گرفت. این آغازگرها در کل ۳۶۹ مکان ژنومی تکثیر نمودند که دراین‌بین ۶۱/۷۷ درصد مکان‌های تکثیری دارای چندشکلی بودند. چندشکلی نسبتاً بالای حاصل در پژوهش حاضر را می‌توان به کارایی بالای نشانگرهای مورد استفاده، وسعت مناطق جغرافیائی نمونه‌برداری شده، هتروزیگوسیتی و دگرگشنی یونجه و به تعداد زیاد ژنوتیپ‌های مورد بررسی نسبت داد (۳۵). تجزیه کلاستر افراد به روش Neighbor Joining قادر به تمایز افراد و جمعیت‌های مورد مطالعه نبود و گروه‌بندی مشخصی برای جمعیت‌های مورد مطالعه ارائه نداد (شکل ۱۰).

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1395.8.19.8.3]



شکل ۱- دندروگرام افراد یونجه مورد مطالعه به روش Neighbor Joining بر اساس ۳۶۹ نشانگر IRAP، REMAP، ISSR و SSR (GhM: قره‌یونجه ملک‌کندی، GhO: قره‌یونجه ارومیه، MEs: محلی اصفهان، Bagh: بغدادی، Ham: همدانی، Aord: آذربایجان اردوباد، Tu: الچی، TuS: ساکوئل

Fig 1. Neighbor Joining dendrogram of the alfalfa genotypes using 369 IRAP, REMAP, ISSR and SSR markers (GhM: Garayonjeh Malekkandi, GhO: Garayonjeh Urmia, MEs: Mahali Esfahan, Bagh: Baghdadi, Ham: Hamadani, Aord: Azerbaijan Ordoubad, Tu: Elchi, TuS: Sakuel

مطالعه ساختار ژنتیکی جمعیت با استفاده از نرم‌افزار STRUCTURE 2.3.4، ۶ زیر جمعیت احتمالی (K=۶) را در افراد مورد مطالعه شناسایی نمود و K=۶ به‌عنوان K بهینه در تخمین ساختار جمعیت، محاسبه ماتریس Q و برآورد میانگین شاخص تثبیت (F_{ST}) برای هر گروه تعیین شد (جدول ۳).

مقادیر F_{ST} همه گروه‌ها کمتر از ۰/۲ بود. پایین بودن مقادیر F_{ST} نشان‌دهنده افتراق ژنتیکی کم و میزان بالای جریان ژنی در بین افراد و جمعیت‌های مورد مطالعه می‌باشد که این مسئله در مورد گونه‌های دگرگشن مانند یونجه قابل انتظار است (۲۱،۱۲). این فرضیه با محاسبه واگرایی فراوانی آللی بین جفت کلاسترها که دارای دامنه محدود و پایین ۰/۰۲۲۴-۰/۰۰۶۰ می‌باشد نیز تأیید شد. در بررسی ماتریس Q و بارپلات (شکل ۲) هم مشخص گردید که افراد هر جمعیت در کلاسترهای مختلفی قرار گرفته‌اند و درواقع هر کلاستر شامل مجموعه‌ای از افراد از جمعیت‌های مختلف است. چنانچه ذکر گردید این مسئله بیانگر میزان بالای جریان ژنی در بین افراد متعلق به جمعیت‌های مختلف مورد مطالعه می‌باشد. افراد جمعیت قرهیونجه ملک‌کندی در کلاسترهای I، V و VI، افراد جمعیت قره یونجه ارومیه در کلاسترهای II، III و VI، افراد جمعیت محلی اصفهان در کلاسترهای II، IV و VI، افراد جمعیت بغدادی در کلاسترهای I، IV و VI، افراد جمعیت همدانی در کلاسترهای II و III، افراد جمعیت آذربایجان اردوباد در کلاسترهای II، III و V، افراد جمعیت الچی در کلاسترهای II و III و افراد جمعیت ساکوئل در کلاسترهای I و II قرار گرفتند.

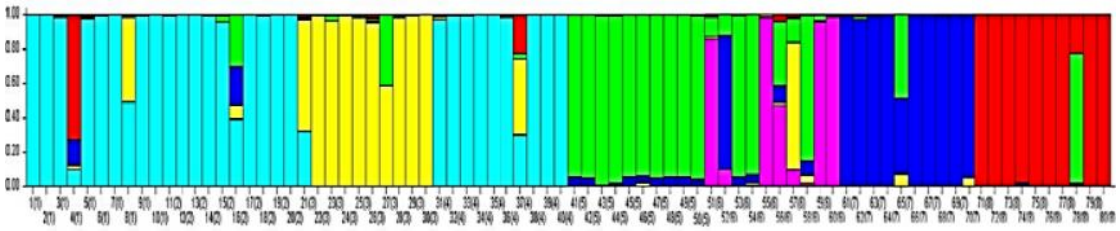
[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1395.8.19.8.3]

جدول ۳- میانگین شاخص تثبیت (F_{ST}) هر کلاستر بر اساس تجزیه کلاستر مبتنی بر مدل Bayesian در K=6

Table 3. Mean of fixation index (F_{ST}) of each cluster measured using Bayesian model-based cluster

کلاستر Cluster	شاخص تثبیت Fixation index	کلاستر Cluster	شاخص تثبیت Fixation index	کلاستر Cluster	شاخص تثبیت Fixation index
I	0.0728	III	0.0598	V	0.1420
II	0.0509	IV	0.0420	VI	0.0568



شکل ۲- تجزیه کلاستر مبتنی بر مدل Bayesian برای ۸۰ فرد یونجه بر اساس ۳۶۹ نشانگر IRAP، REMAP،ISSR و SSR(K=6). هر رنگ یک زیر جمعیت یا کلاستر را نشان می‌دهد. اعداد روی محور افقی و عمودی به ترتیب شماره افراد و ضریب تعلق هر فرد به هر کلاستر را نشان می‌دهد.

Fig 2. Bayesian model-based cluster analysis of 80 alfalfa genotypes based on 369 IRAP, REMAP, ISSR and SSR markers(K=6). Each color represents a sub-population or cluster. Digits on horizontal and vertical axis shows genotype number and cluster membership coefficients, respectively.

تجزیه ارتباط: صفات پیچیده و مهم زراعی تحت تأثیر QTLهای متعدد، محیط و تعامل بین QTL و محیط است. تجزیه لینکاژ و مکان‌یابی ارتباطی دو روش معمول و پرکاربرد برای بررسی صفات پیچیده می‌باشند. روش تجزیه لینکاژ در گیاهان، QTLهای مورد بررسی را در فاصله ۱۰ تا ۲۰ سانتی مورگانی مکان‌یابی می‌کند، زیرا افراد مورد مطالعه کم بوده و تعداد موارد نوترکیبی در جمعیت مکان‌یابی محدود می‌باشد (۱۴). در حالی‌که صدها مطالعه تجزیه لینکاژ در گونه‌های مختلف گیاهی در طی دو دهه اخیر صورت گرفته است، تنها تعداد محدودی از QTLهای شناخته‌شده، همسانه‌سازی شده یا در سطح ژن بررسی شده‌اند (۲۹،۱۹). درحالی‌که در مکان‌یابی ارتباطی، QTLهای دخیل در صفات پیچیده در یک جمعیت متنوع در فاصله ژنتیکی محدودتری مکان‌یابی می‌شوند (۳۷،۷). این روش به دو صورت مکان‌یابی ارتباطی کل ژنوم و مکان‌یابی ارتباطی ژن کاندید صورت می‌گیرد. مکان‌یابی ارتباطی کل ژنوم یک روش جامع برای بررسی سیستماتیک ژنوم جهت شناسایی عوامل ژنتیکی دخیل در صفات می‌باشد. در این روش تعداد زیادی نشانگر برای ارتباط با صفات پیچیده مختلف تست‌شده، و اطلاعات قبلی در مورد ژن‌های کاندید نیاز نیست. چالش اصلی در مکان‌یابی ارتباطی تمییز روابط حقیقی بین نشانگرها و صفات از روابط کاذب ناشی از ساختار جمعیت و روابط خویشاوندی است که البته در این بی نتأثیر روابط خویشاوندی در ارائه نتایج مثبت کاذب بیشتر از ساختار جمعیت هست (۲۲). با توجه به مزایای این روش در این مطالعه برای شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات مورفولوژیک در یونجه از تجزیه ارتباط به روش مدل خطی مخلوط (MLM) استفاده شد. در این مدل علاوه بر ساختار جمعیت، روابط خویشاوندی بین افراد جمعیت نیز در تجزیه ارتباط به‌عنوان کواریت در نظر گرفته می‌شود و بنابراین ارتباطات و پیوستگی‌های دروغین بین نشانگر و صفت به حداقل می‌رسد. همچنین میزان تأثیر نشانگرها به‌وسیله ضریب Benferroni تصحیح گردید که این تصحیح نیز باعث کاهش ارتباطات دروغین نشانگر صفت می‌شود (۳۶). در کل ۹۵ نشانگر که ارتباط معنی‌داری (P-value کمتر از ۰/۰۲) با صفات مورد مطالعه داشتند شناسایی شد (جدول ۴). در بین نشانگرهای شناسایی شده مرتبط با صفات مورد مطالعه، نشانگرهای مبتنی بر رتروترنسپوزون‌ها (IRAP و REMAP) ۵۴ درصد و نشانگرهای مبتنی بر توالی‌های ساده تکراری (ISSR و SSR) ۴۶ درصد را شامل می‌شدند. درصد بالای چندشکلی‌های مرتبط با صفات برای نشانگرهای رتروترنسپوزونی را می‌توان به فعالیت بالای رتروترنسپوزون‌ها در ژنوم یونجه و درج آن‌ها در نواحی یوکروماتینی و ژنی نسبت داد (۳). در بررسی عملکرد زیست‌توده و ترکیب ساقه به‌وسیله نشانگرهای SSR در جمعیت‌های اصلاح شده یونجه تتراپلوئید، ۶۱/۵ درصد نشانگرهای مورد مطالعه با صفات مورد بررسی ارتباط معنی‌داری داشتند (۲۲). نشانگر ISSR14-4 با ۹ صفت ارتفاع، میزان کلروفیل، وزن‌تر کل، وزن‌تر برگ، وزن خشک برگ، وزن‌تر ساقه، وزن خشک ساقه و تعداد ساقه مرتبط بود که نشان‌دهنده اثر پلیوتروپی این نشانگر و احتمالاً پیوستگی مکان‌های ژنومی کنترل‌کننده این صفات می‌باشد. نشانگرهای IR6-6، IR6-5 و RE5-5 هرکدام با ۷ صفت مرتبط بودند. نشانگرهای مرتبط با وزن خشک و وزن‌تر ساقه بیشترین ارتباط را با سایر صفات دارا هستند که این مسئله اهمیت ساقه در میزان علوفه یونجه و عملکرد آن را تأیید می‌نماید. چنین نتایجی در مطالعات قبلی این صفات نیز حاصل شده است (۹). از بین صفات مطالعه شده، صفت وزن خشک کل به وزن‌تر کل با ۳ نشانگر و پس از آن صفات ارتفاع، تعداد برگ و تعداد ساقه، هرکدام با ۴ نشانگر مرتبط، کمترین تعداد نشانگرهای مرتبط را دارا بودند.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1395.8.19.8.3]

محمدی و همکاران (۲۷) کمترین تعداد نشانگر SSR مؤثر (یک نشانگر) را برای صفت وزن خشک برگ در یونجه گزارش نمودند (۲۷). بیشتر نشانگرهای مرتبط با دو صفت وزن خشک کل و وزن خشک برگ یکسان بودند. در مطالعات قبلی نیز همبستگی مثبت و معنی‌داری بین این دو صفت گزارش‌شده است (۳۱). همچنین وجود نشانگرهای مشترک در میان برخی صفات بررسی شده در مطالعه حاضر می‌تواند ناشی از اثرات پلیوتروپی و یا پیوستگی نواحی ژنومی دخیل در این صفات باشد (۱۸). محمدی و همکاران با استفاده از نشانگرهای SSR و رگرسیون گام‌به‌گام ۱۷ نشانگر را در یونجه شناسایی نمودند که رابطه معنی‌داری با حداقل یکی از ۱۱ صفت مورفولوژیک مطالعه شده نشان دادند (۲۷). در مطالعه نقشه‌یابی ژنتیکی تولید زیست‌تودهدر یونجه تتراپلوئید با استفاده از نشانگرهای RFLP و SSR، ۷ آلل شناسایی شد که با تولید زیست‌توده در بیش از یک دوره نمونه‌گیری مرتبط بودند (۳۰). به‌منظور شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات مورفولوژیک در بادام‌زمینی به روش تجزیه ارتباط با استفاده از نشانگرهای SSR گزارش شد که این روش برای شناسایی مکان‌های مرتبط با صفات مورفولوژیک مفید بوده و نشانگرهای مؤثر حاصل از این مطالعات می‌تواند در برنامه‌های گزینش به کمک نشانگر و تهیه جمعیت‌های نقشه‌یابی استفاده شوند (۱). در مطالعه تجزیه ارتباط صفات مورفولوژیک گندم نان به‌وسیله نشانگرهای SSR، AFLP و SAMPL بروش رگرسیون گام‌به‌گام، ۵۱ نشانگر شناسایی شدند که با حداقل یکی از صفات ارتباط داشتند و پیشنهاد شد که این نشانگرها قابلیت کاربرد در برنامه‌های اصلاح به کمک نشانگر را دارند (۳۲).

جدول ۴- نشانگرهای پیوسته با صفات مورد مطالعه در ۸۰ فرد یونجه (P-value کمتر از ۰/۰۲)

Table 4. Markers associated with studied traits in 80 alfalfa genotypes (P≤0.02)

Marker	P-value	R^2	Marker	P-value	R^2	Marker	P-value	R^2
ارتفاع Height			تعداد برگ Number of leaves			تعداد ساقه Number of stems		
IR6-6	0.017	0.074	IR2-4	0.001	0.129	IR2-4	0.001	0.143
RE5-6	0.011	0.082	RE11-5	0.017	0.076	IR6-5	0.004	0.113
ISSR9-2	0.006	0.087	ISSR4-4	0.010	0.083	RE5-5	0.003	0.114
ISSR14-4	0.018	0.068	ISSR13-9	0.006	0.095	ISSR14-4	0.019	0.072
وزن خشک ساقه Dry stem weight			میزان کلروفیل Chlorophyll content			وزن‌تر کل Total wet weight		
IR4-9	0.008	0.089	IR8-4	0.002	0.12	IR5-6	0.012	0.083
IR2-4	0.012	0.085	IR4-11	0.006	0.1	IR2-4	0.004	0.107
IR5-6	0.005	0.106	IR8-7	3.66E-04	0.16	IR6-5	0.008	0.092
IR6-5	0.008	0.092	RE7-4	0.008	0.091	IR6-6	0.013	0.08
IR6-6	0.003	0.111	ISSR6-3	0.015	0.074	RE5-5	0.009	0.086
RE5-5	0.011	0.084	ISSR14-3	0.013	0.073	ISSR14-4	1.07E-04	0.176
ISSR14-4	6.17E-04	0.144	ISSR14-4	2.14E-08	0.307	SSR2-4	0.016	0.072
ISSR15-5	0.014	0.075	ISSR15-6	0.012	0.077	SSR2-6	0.006	0.091
ISSR12-7	0.015	0.07	SSR2-4	0.004	0.102	SSR2-7	0.005	0.096
وزن خشک برگ Dry leaf weight			وزن‌تر ساقه Wet stem weight			وزن خشک کل Total dry weight		
IR4-4	0.019	0.072	IR2-4	0.002	0.119	IR2-4	0.013	0.082
IR5-6	0.014	0.082	IR4-9	0.009	0.084	IR4-9	0.015	0.075
IR6-5	0.013	0.083	IR4-11	0.017	0.070	IR5-6	0.006	0.102
IR6-6	0.011	0.087	IR5-6	0.005	0.104	IR6-5	0.008	0.094
RE3-7	0.015	0.075	IR6-5	0.009	0.09	IR6-6	0.004	0.107
RE5-1	0.004	0.107	IR6-6	0.011	0.084	RE5-1	0.017	0.073
RE5-5	0.015	0.077	RE5-5	0.015	0.075	RE5-5	0.010	0.086
ISSR14-4	1.16E-04	0.182	RE9-3	0.017	0.063	ISSR14-4	1.69E-04	0.171
SSR2-4	0.019	0.071	ISSR13-7	0.019	0.068	ISSR15-5	0.019	0.067
SSR2-6	0.017	0.073	ISSR14-4	2.68E-04	0.158	ISSR12-7	0.014	0.072
SSR2-7	0.018	0.073	ISSR15-5	0.01	0.080	SSR2-6	0.015	0.074
			SSR2-6	0.012	0.077	SSR2-7	0.019	0.070
			SSR2-7	0.005	0.097			
وزن‌تر برگ Wet leaf weight			تعداد برگ به تعداد ساقه Number of leaves/Number of stems			وزن خشک برگ به وزن خشک ساقه Dry leaf weight/Dry stem weight		
IR6-5	0.009	0.086	IR6-6	0.003	0.118	ISSR8-7	0.017	0.077
RE5-5	0.008	0.087	IR7-14	0.012	0.085	ISSR8-12	0.013	0.084
ISSR14-4	1.20E-04	0.174	RE1-6	0.007	0.093	ISSR13-2	0.018	0.086
SSR2-4	0.007	0.089	ISSR14-2	0.011	0.085	ISSR16-9	0.004	0.109
SSR2-6	0.005	0.095	ISSR12-1	0.014	0.076	IR7-12	0.017	0.080
SSR2-7	0.008	0.088	ISSR12-5	0.004	0.092			
وزن خشک کل به وزن‌تر کل Total dry weight/Total wet weight								
RE7-2	0.003	0.106						
ISSR11-3	0.016	0.071						
ISSR13-4	0.008	0.081						

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1395.8.19.8.3]

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که استفاده از روش MLM همراه با ترکیبی از نشانگرهای مختلف می‌تواند در شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات مورفولوژیک در یونجه مؤثر باشد. البته بهتر است جهت افزایش کارایی شناسایی نشانگرهای مرتبط، از نشانگرهای بیشتر و موثرتر مانند نشانگرهای SNP و SSR در مطالعات تجزیه ارتباط استفاده شود همچنین لازم است نشانگرهایشناسایی‌شده در چنین مطالعاتی در جمعیت‌های بزرگ مورد بررسی قرار گیرد تا از ارتباط آن‌ها با صفات مورد مطالعه اطمینان حاصل شود و بدین ترتیب کارآیی کاربرد این نشانگرها در برنامه‌های اصلاحی افزایش یابد. 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 آغازگرها در برنامه‌های اصلاحی یونجه برای شناسایی والدین مناسب برای تهیه جمعیت‌های نقشه‌یابی و تولید ارقام هیبرید یا نیمه هیبرید استفاده کرد. از سویی یافته‌های این پژوهش کارآمدی روش مکان‌یابی ارتباطی را در شناسایی دقیق و مؤثر مکان‌های کنترل‌کننده صفات در سطح ژنوم اثبات می‌نماید که در قدم‌های بعدی می‌توان ژن‌های دخیل در کنترل صفات مهم نظیر عملکرد و مقاومت به پاتوژن‌ها را شناسایی نمود و با استفاده از تکنیک‌های مهندسی ژنتیک این ژن‌ها را به جمعیت‌ها و واریته‌های فاقد آن‌ها انتقال داد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله نگارندگان از دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه و پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه ارومیه که امکانات لازم برای انجام تحقیق را فراهم نمودند قدردانی می‌نمایند.

منابع

1. Abdollahi Mandoulakani, B. 2013. Study of genetic diversity in some populations of cultivated alfalfa (*Medicago sativa* L.) using morphological traits. Modern Genetics Journal, 4: 381-388 (In Persian).
2. Abdollahi Mandoulakani, B., A. Aalami and M. Esfahani. 2010. Association analysis for morphological traits in peanut (*Arachis hypogea* L.) using microsatellite markers. Iranian Journal of Crop Sciences, 12: 510-519 (In Persian).
3. Abdollahi Mandoulakani, B., S. Arzhangh, Y. Piri and F. Nozohour. 2011. Study of genetic diversity in some cultivated alfalfa using SSR markers. 12th Iranian genetic congress, Tehran, Iran (In Persian).
4. Abdollahi Mandoulakani, B., Y. Piri, R. Darvishzadeh, I. Bernoosi and M. Jafari. 2012. Retroelement Insertional Polymorphism and Genetic Diversity in *Medicago sativa* Populations Revealed by IRAPand REMAP Markers.Plant Molecular Biology Reporter, 30: 286-296
5. Azizi, H., I. Bernousi, B. Abdollahi and R. Darvishzadeh. 2011. Study of genetic structure and diversity of Alfalfa populations using ISSR markers. Modern Genetics Journal, 6: 61-69 (In Persian).
6. Bahar, M., S. Ghobadi, V. Erfani Moghadam, A. Yamchi, M. Talebi Bedaf, M.M. Kaboli and A.A. Mokhtarzadeh. 2007. Assessment of genetic diversity in Iranian alfalfa landraces using ESTs markers. Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources, 2: 141-153 (In Persian).
7. Balding, D.J. 2006. A tutorial on statistical methods for population association studies. Nature Publishing Group, 7: 781-791.
8. Barcaccia, G., E. Albertin, S. Tavoletti, M. Falcinelli and F. Veronesi. 1999. AFLP fingerprinting in Medicago spp: Its development and application in linkage mapping. Plant Breeding, 118: 335-341.
9. Basafa, M. and M. Taheri. 2006. Genetic diversity among alfalfa ecotypes in cold regions using morphological markers. Journal of Plant Science, 8: 121-137 (In Persian).
10. Bradbury, P.J., Z. Zhang, D.E. Kroon, T.M. Casstevens, Y. Ramdoss and E.S. Buckler. 2007. TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. Bioinformatics, 23: 2633-2635.
11. Brouwer, D.J., S.H. Duke and T.C. Osborn. 2000. Mapping genetic factors associated with winter hardiness, fall growth and freezing injury in autotetraploid alfalfa. Crop Science, 40: 1387-1397.
12. Carvalho, A., H. Guedes-Pinto, M. Lopes and P. Lima-Brito. 2010. Genetic variability of old Portuguese bread wheat cultivar assayed by IRAP and REMAP markers. Annual of Applied Biology, 156: 337-345.
13. 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.
14. Doerge, R.W. 2002. Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations. Nature Reviews Genetics, 3: 43-52.
15. Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 12: 13-15.
16. Earl Dent, A.,V. Holdt and M. Bridgett. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. Conservation Genetics Resources, 4: 359-361.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1395.8.19.8.3]

17. Evanno, G., S. Regnaut and J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Molecular Ecology, 14: 2611-2620.
18. Falahati-Anbaran, M., A.A. Habashi, M. Esfahani, S.A. Mohammadi and B. Gharayazi. 2007. Population genetic structure based on SSR markers in alfalfa (*Medicago sativa* L.) from various regions contiguous to the centers of origin of the species. Journal of Genetics, 1: 59-63.
19. Holland, J.B. 2007. Genetic architecture of complex traits in plants. Current Opinion in Plant Biology, 10: 156-161.
20. Ivandic, V.C., A. Hackett, E. Nevo, R. Keith, W.T.B. Thomas and B.P. Foster. 2002. Analysis of simple sequence repeat (SSRs) in wild barley from the Fertile Crescent: associations with ecology, geography and flowering time. Plant Molecular Biology, 48: 511-527.
21. Jun, T.H., K. Van, M.Y. Kim, S.H. Lee and D.R. Walker. 2008. Association analysis using SSR markers to find QTL for seed protein content in soybean. Euphytica, 62: 179-191.
22. Li, X., Y. Wei, K.J. Moore, R. Michaud, D.R. Viands, JL. Hansen, A. Acharya and E.C. Brummer. 2011. Association mapping of biomass yield and stem composition in a tetraploid alfalfa breeding population. The plant genome, 4: 24-35.
23. Li, X., Y. Han, Y. Wei, A. Acharya and A.D. Farmer. 2014. Development of an alfalfa SNP array and its use to evaluate patterns of population structure and linkage disequilibrium. PLoS One, 9: p.e84329.
24. Liu, K., M. Goodman, S. Muse, J.S. Smith, E.D. Buckler and J. Doebley. 2003. Genetic structure and diversity among maize inbred lines as inferred from DNA microsatellites. Genetics, 165: 2117-2128.
25. McKersie, B.D. and D.C. Brown. 1997. Biotechnology and the improvement of forage legumes. CAB International, Oxon, UK, 3-21.
26. Michaud, R., W. Lehman and M. Rumbaugh. 1988. World distribution and historical development. Alfalfa and alfalfa improvement, 25-91.
27. Mohammadi, R., M.R. Naghavi, R. Maali Amiri and M. Rezaei. 2010. Identification of microsatellite markers in Iranian alfalfa. Modern Genetics Journal, 5: 7-66 (In Persian).
28. Narasimhamoorthy, B., J.H. Bouton, K.M. Olsen and M.K. Sledge. 2007. Quantitative trait loci and candidate gene mapping of aluminum tolerance in diploid alfalfa. Theatrical and Applied Genetics, 114: 901-913.
29. Nordborg, M. and S. Tavare. 2002. Linkage disequilibrium: What history has to tell us? Trends in Genetics, 18: 83-90.
30. Pritchard, J.K., M. Stephens and P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics, 155: 945-959.
31. Robins, J.G., T. Campbell, G.R. Bauchan, C. He, D.R. Viands, J.L. Hansen and E.C. Brummer. 2007. Genetic Mapping of Biomass Production in Tetraploid Alfalfa. Crop Science, 47: 1-10.
32. Roy, J.K., R. Bandopadhyay, S. Rustgi, H.S. Balyan and P.K. Gupta. 2006. Association analysis of agronomically important traits using SSR, SAMPL and AFLP markers in bread wheat. Current Science, 90: 5-10.
33. Saremi Rad, B., M. Shokrpour, O. Sofalian, S.E. Hashemi Nezhad, A. Avans and E. Esfandiari. 2016. Association analysis of AFLP and RAPD markers with Cadmium accumulation in wheat. Journal of Crop Breeding, 8: 126-133 (In Persian).
34. Soltani, A., Z. Khodarahmpour and A. Ashraf Jafari. 2012. Study of genetic diversity tolerance to salinity stress in alfalfa (*Medicago sativa* L.) varities basis on seedling growth. Journal of Crop Breeding, 4: 29-45 (In Persian).
35. Veronesi, F., B. Charles and C. Huyghe. 2010. Alfalfa. Springer Science, 395-436.
36. Zhang, Z., E. Ersoz, C.Q. Lai, R.J. Todhunter, H.K. Tiwari, M.A. Gore, P.J. Bradbury, J. Yu, D.K. Arnett, J.M. Ordovas and E.S. Buckler. 2010. Mixed linear model approach adapted for genome-wide association studies. Nature Genetics, 24: 355-362.
37. Zhu Ch., M. Gore, E.S. Bucker and J. Yu. 2008. Status and prospects of association mapping in plants. The plant genome, 1: 5-20.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1395.8.19.8.3]

Association Analysis for Morphological Traits in Cultivated Alfalfa using Molecular Markers

Babak Abdollahi Mandoulakani[1], Heydar Azizi[2], Yaser Piri[3], Sasan Rahmanpour[4] and Leyla Hassani[4]

1- Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Urmia University, (Corresponding author: b.abdollahi@urmia.ac.ir)
2- Ph.D. Student, University of Guilan
3- Ph.D. Student, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB)
4- M.Sc. Student, Urmia University
Received: September 13, 2014 Accepted: February 21, 2015

Abstract

In the current investigation, 10 IRAP, 14 REMAP, 16 ISSR and 7 SSR primers and mixed linear model (MLM)-based association analysis were used to identify molecular markers associated with 13 morphological traits in cultivated alfalfa (*Medicago sativa* L.). Morphological traits studied, were height, chlorophyll content, total wet weight, total dry weight, wet leaf weight, dry leaf weight, wet stem weight, dry stem weight, number of leaves, number of stems, number of leaves/number of stems, dry leaf weight/dry stem weight and total dry weight/total wet weight. Analysis of genetic structure of the populations revealed 6 sub-populations (K=6). In general, MLM association analysis identified 95 markers associated with studied traits ($P \leq 0.02$). Fifty-four percentages of the associated markers were retrotransposon-based markers (IRAP and REMAP), while SSR and ISSR markers constituted 46 percentage of the associated markers. Marker ISSR14-4 was associated with 8 traits. The maximum number of markers (13) was associated with dry stem weight. Markers associated with dry stem weight and wet stem weight was also linked to the other studied traits.Results of the current study presented useful information about the genetic basis of the traits studied and can be used in alfalfa breeding programs to produce hybrids with high biomass.

Keywords: Association Analysis, Cultivated Alfalfa (*Medicago sativa* L.), MLM, Molecular Markers, Morphological Traits

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1395.8.19.8.3]