

## بررسی ایزوزیم‌های استراز و پراکسیداز در جمعیت‌های بومی و اصلاح شده یونجه و ارتباط آن‌ها با صفات زراعی و مورفولوژیکی

مریم احمدی<sup>۱</sup>، مصطفی ولیزاده<sup>۲\*</sup>، محمود تورچی<sup>۲</sup>، محمد مقدم واحد<sup>۲</sup> و حسین محمد زاده جلالی<sup>۱</sup>

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز، تبریز

۲- استاد، گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز، تبریز

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۰/۰۵ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۲/۲۴)

### چکیده

به‌منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی ارقام اصلاح شده و بومی یونجه، ۱۲ رقم یونجه شامل پنج رقم اصلاح شده (کایساری، کدی، رنجر، مسمیر و سی ریور) و هفت رقم بومی (همدانی، قره یونجه، یزدی، تازه کند دیم، شازند، عموزین‌الدین و رهنانی) از طریق صفات زراعی و نشانگرهای آنزیمی مورد مطالعه قرار گرفتند. تعداد ۳۵ بذر از هر رقم در گلدان‌های مجزا به‌صورت طرح کاملاً تصادفی نامتعادل، کشت شدند. تجزیه واریانس صفات مختلف نشان داد که بین ارقام بومی و اصلاح شده یونجه از لحاظ اکثر صفات اختلاف معنی‌دار وجود ندارد. در مورد آنزیم‌های استراز و پراکسیداز، داده‌ها بر اساس وجود و عدم وجود نوار آنزیمی (۱ و ۰) در ۱۱ نوار ایزوزیمی پلی‌مورف مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. ارقام بومی و اصلاح شده به‌ترتیب با میانگین  $0/246 \pm 0/48$  و  $0/193 \pm 0/519$  برای شاخص شانون و میانگین  $0/181 \pm 0/327$  و  $0/148 \pm 0/352$  برای شاخص تنوع ژنتیکی نی، تفاوت چشمگیری نشان ندادند. بررسی رابطه‌ی بین داده‌های ایزوزیمی و صفات مورد بررسی نشان داد که بین ایزوزیم POX-4 و عملکرد تک بوته تر و خشک در ارقام اصلاح شده ارتباط معنی‌دار وجود دارد.

**واژگان کلیدی:** یونجه، تنوع ژنتیکی، نشانگرهای ایزوزیمی، چندشکلی

\* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: [mvalizadeh@tabrizu.ac.ir](mailto:mvalizadeh@tabrizu.ac.ir)

## مقدمه

یونجه (*Medicago sativa* L.) یکی از مهم‌ترین گیاهان علوفه‌ای در دنیا محسوب می‌شود و عقیده بر این است که از نواحی شمال غربی ایران، جنوب قفقاز، شمال شرقی ترکیه و ترکمنستان منشأ گرفته باشد (Michaud *et al.*, 1988). یونجه با دارا بودن ساختار ژنتیکی اتوتتراپلوئیدی ( $2n = 4x = 32$ ) و دگرگشی، تغییرپذیری زیادی در سطح ژنوم دارد. وجود تغییرپذیری زیاد، شناسایی واریته‌های مختلف را توسط صفات زراعی و مورفولوژیکی مشکل می‌سازد (Corts and Martinez, 2000). مطالعات سینولوژیکی نشان می‌دهد که یونجه میوز منظم با ۱۶ بی‌ولنت و تعداد کمی مولتی‌والنت دارد (McCoy and Bingham, 1988). منابع ژنتیکی، تأمین کننده ژن‌های با ارزشی هستند که در صورت بهره‌برداری صحیح از آن‌ها می‌توان ارقام جدید و مطلوب را تولید کرد. در واقع تنوع ژنتیکی پیش‌نیاز گزینش در برنامه‌های به‌نژادی برای بهبود صفات و تولید ارقام جدید و سازگار می‌باشد (Oleson, 1994; Clegg, 1997). در جمعیت‌های طبیعی، جهش‌های مکرر در یک ژن باعث ایجاد تنوع می‌شوند (Zeidler, 2000). برای ارزیابی تنوع ژنتیکی، نشانگرها عموماً بهتر از داده‌های مورفولوژیکی و شجره‌ای هستند و تنوع ژنتیکی معمولاً توسط فاصله ژنتیکی یا تشابه ژنتیکی اندازه‌گیری می‌شود (Lamkey and Lee, 1993). روش‌های کلاسیک اصلاح‌نباتات به تدریج تنوع ژنتیکی را کاهش می‌دهند و این کاهش می‌تواند برای آینده برنامه‌های اصلاحی خطرآفرین باشد (Corts and Martinez, 2000). نشانگرهای مولکولی در زمینه مطالعه تنوع ژنتیکی و روابط بین ژرم‌پلاسم‌ها بسیار مفید هستند و می‌توانند برای شناسایی جمعیت‌های مناطق مختلف مورد استفاده واقع شوند (Veronesi *et al.*, 2003). امروزه نشانگرهای مولکولی متعددی برای برآورد تنوع ژنتیکی وجود دارد ولی الکتروفورز پروتئین‌ها همواره روشی ساده و مرسوم برای برآورد تنوع ژنتیکی در گیاهان به شمار رفته است، زیرا ارتباط آن‌ها با بخش فعال ماده ژنتیکی

(ژن‌های ساختاری) بیشتر از اغلب نشانگرهای مبتنی بر DNA است (Corts and Martinez, 2000). از ایزوزیم‌ها می‌توان برای مطالعه ژرم‌پلاسم گیاهان استفاده کرد. تنوع ژنتیکی یا فاصله ژنتیکی از طریق بررسی تنوع آلوزایمی قابل اندازه‌گیری است و تعیین و تشخیص یک جمعیت یا رقم زراعی، شناسایی اختلاف ژنتیکی افراد، تعیین روابط ژنتیکی در داخل گونه‌ها، تجزیه و تحلیل الگوهای مهاجرتی یک گونه از مراکز اولیه از جمله موارد عمده استفاده از ایزوزیم‌ها در مطالعات تنوع ژنتیکی است (Labdi *et al.*, 1996). اولین بار کوپروس (Quiros, 1980) از الکتروفورز آنزیم‌های استراز، پراکسیداز، اسیدفسفاتاز و لوسین آمینوپپتیداز با ژل نشاسته برای شناسایی ژنوتیپ‌های یونجه استفاده کرد و گزارش نمود که سه آنزیم اول در برگ بوته‌های مادری الگوی نواریندی متفاوت و قابل شناسایی ایجاد می‌کنند. وی این روش را در سایر گونه‌های یونجه نیز مورد استفاده قرار داد. کالچوند و جاسکا (Kaljund and Jaaska, 2010) نشانگرهای آلوزایمی مولکولی سه ایزوزیم چند شکل را برای تخمین تنوع ژنتیکی وابسته به اندازه جمعیت و درجه دوری، بین نتاج حاصل از بذر در جمعیت‌های یونجه گونه *M. sativa* و گونه‌ی *M. falcata* استفاده کردند و به این نتیجه رسیدند که حتی کوچک‌ترین جمعیت تنوع ژنتیکی بالایی در حدود جمعیتی که صد بار از آن بزرگ‌تر بود را داشت. همچنین تفاوت ژنتیکی جمعیت‌ها به استثنای یک جمعیت دور، در دو گروه اصلی با موقعیت جغرافیایی جمعیت‌ها مرتبط بود. هدف از این پژوهش بررسی میزان تنوع در جمعیت‌های بومی و اصلاح شده یونجه از طریق نشانگرهای ایزوزیمی و ارتباط این نشانگرها با صفات زراعی و مورفولوژیکی بود.

## مواد و روش‌ها

آزمایش در سال ۱۳۸۹ در ایستگاه تحقیقات دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز در اراضی کرکج واقع در دوازده کیلومتری شرق تبریز اجرا گردید. مواد گیاهی شامل پنج رقم اصلاح شده (کایساری، کدی، رنجر، مسمیر و سی

رنگ‌آمیزی ژل از روش کار سولتیس و سولتیس (Soltis and Soltis, 1990) استفاده شد و سپس توسط دوربین دیجیتالی از ژل‌ها عکس‌برداری شد. الگوهای آنزیمی در جمعیت‌های یونجه به صورت وجود نوار پروتئینی (امتیاز یک) و عدم وجود (امتیاز صفر) یادداشت گردید. فراوانی‌های ایزوزیمی به صورت صفر و یک در جمعیت‌های مورد مطالعه محاسبه شد. میانگین هتروزیگوتی مورد انتظار با فرض تعادل ( $H_e$ ) به شرح زیر برآورد گردید. میزان هتروزیگوتی از طریق  $H_e = 1 - \sum p_i^2$  برآورد شد که در آن  $P_i$  فراوانی آلل  $i$  در یک مکان ژنی در یک جمعیت است. تعداد آلل‌های مؤثر از طریق فرمول  $n_e = \frac{1}{1 - \hat{H}}$  برآورد شد که در آن  $\hat{H}$  میزان هتروزیگوسی مورد انتظار است (Hedrick, 2005). شاخص تنوع ژنتیکی نی به صورت  $H_s = \frac{1}{k} \cdot \sum_{s=1}^k H_{ss} = \frac{1}{k} \cdot \sum_{s=1}^k [1 - q_s^2 - (1 - q_s)^2]$  برآورد شد (Nei, 1973) که در آن  $k$  تعداد مکان‌های ژنی و  $q_s$  فراوانی آلل مشهود است. شاخص تنوع ژنتیکی شانون به صورت  $H = -\sum_{i=1}^s p_i \ln(p_i)$  برآورد شد که در آن  $H$  شاخص شانون،  $p_i$  فراوانی جمعیت  $i$ ام می‌باشد، تعیین فاصله و شباهت بین جمعیت‌ها با استفاده از ضریب فاصله و شباهت نی انجام شد. برای محاسبات فوق از نرم‌افزارهای POPGENE V 1.31 (Yeh et al., 1999) و Excel V 2007 استفاده شد. صفات وزن هزاردانه، تاریخ گلدهی، ارتفاع گیاه، تعداد ساقه فرعی، تعداد میانگره در زمان گلدهی، طول و عرض برگ لپه‌ای، فاصله‌ی برگ لپه‌ای از سطح خاک، طول اولین میانگره، طول دم‌برگ اولین سه برگچه، وزن تر در زمان گلدهی، وزن خشک بوته، نسبت برگ به ساقه مورد اندازه‌گیری قرار گرفتند و بر روی داده‌ها بر اساس طرح پایه کاملاً تصادفی تجزیه واریانس و مقایسه میانگین به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن توسط SPSS V17 انجام شد. اکثر صفات زراعی در دو چین اندازه‌گیری شدند و برای صفاتی غیر از عملکرد و

ریور) و هفت رقم بومی (همدانی، قره یونجه، یزدی، تازه کند دیم، شازند، عمو زین‌الدین و رهنانی) بود. طرح به صورت کاملاً تصادفی نامتعادل با ۱۲ تیمار انجام شد. جهت اندازه‌گیری صفات گیاهی یونجه، ۳۵ گلدان برای هر جمعیت در نظر گرفته شد. ابعاد گلدان‌ها  $15 \times 15 \times 20$  سانتیمتر بود. در مجموع ۴۲۰ گلدان کشت شدند. خاک گلدان‌ها با نسبت‌های ۱:۱:۲، به ترتیب از خاک، کود دامی و ماسه پر شدند. بعد از سبز شدن و استقرار گیاه در گلدان‌ها، اقدام به تنک کردن گیاهچه‌ها شده و در هر گلدان تنها یک بوته برای اندازه‌گیری‌های مزرعه‌ای و بررسی‌های مولکولی باقی می‌ماند. تجزیه‌های ایزوزیمی روی برگ‌های جوان و ساقه اصلی با موقعیت مشخص انجام شد. پس از نمونه‌برداری، نمونه‌ها در دمای چهار درجه سانتی‌گراد (بر روی یخ) از مزرعه به آزمایشگاه به منظور استخراج آنزیم‌ها منتقل شدند. برای استخراج آنزیم‌ها از محلول تریس (۱۲۰ میلی‌مولار)، ساکارز (۵ درصد)، اسید آسکوربیک (۵۰ میلی‌مولار)، سدیم متابی‌سولفیت (۲۰ میلی‌مولار) و PEG-۶۰۰۰ (۲ درصد) با  $pH = 7.5$  استفاده شد. قبل از استخراج، محلول فوق ۲-مرکاپتواتانول به مقدار ۰/۱ درصد اضافه - شد. بدین منظور برگ‌ها با نسبت ۵:۱ از بافر استخراج به خوبی هم‌زنی‌شده شد و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند (Valizadeh et al., 2011). ژل‌های اکریل‌آمید افقی به ضخامت ۶ میلی‌متر و غلظت ۷ درصد با استفاده از محلول پولیک با عرض ۱۰ و طول ۲۰ سانتی‌متر تهیه شدند. پس از بارگذاری در مخزن، الکتروفورز با بافر تریس ۳۲ میلی‌مولار، اسید بوریک ۰/۶ میلی‌مولار، EDTA ۰/۱ میلی‌مولار و  $pH = 8.8$  صورت گرفت. ولتاژ منبع الکتریسته روی ۱۹۶ ولت تنظیم شد. بعد از حدود ۴-۵ ساعت حرکت آبی بروموفنول از محل نمونه‌ها به نزدیک ۸ سانتی‌متر رسید. بعد از پایان الکتروفورز، ژل صفحه‌ای توسط سیم برشی از پهنا برش داده شد تا هر لایه از ژل برای یکی از آنزیم‌ها رنگ‌آمیزی شود. جهت

تاریخ گلدهی، میانگین دو چین، برای صفات عملکرد مجموع دو چین و برای تاریخ گلدهی داده‌های هر چین جهت تجزیه واریانس و سایر برآوردها مورد استفاده قرار گرفت. برای بررسی ارتباط نوارهای آنزیمی و صفات مختلف از تجزیه واریانس استفاده شد به این ترتیب که افراد دارای باند در یک گروه و افراد فاقد باند در گروه دیگر و داده‌های صفات مختلف این دو گروه که برای هر فرد مشخص بود توسط SPSS V17 مورد تجزیه واریانس قرار گرفتند.

### نتایج و بحث

در مورد صفات زراعی و مورفولوژیکی نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بین ۱۲ جمعیت یونجه برای کلیه صفات مورد بررسی اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد وجود دارد (جدول ۱). با توجه به هتروزیگوسیتی زیاد و دگرگشتی قابل توجه در یونجه، تنوع زیاد صفات مورد انتظار می‌باشد (Veronesi et al., 2010). عبدالمی (Abdollahi, 2013) آزمایشی به منظور تعیین تنوع ژنتیکی ۱۱۰ ژنوتیپ متعلق به ۱۱ جمعیت مختلف یونجه زراعی با استفاده از ۱۳ صفت مورفولوژیک انجام داد که جمعیت‌ها از نظر صفات مورد بررسی اختلاف معنی‌داری در سطح ۱ درصد نشان دادند. تجزیه واریانس صفات مختلف در جمعیت‌های بومی و اصلاح شده نشان داد که اختلاف معنی‌دار بین دو جمعیت در رابطه با صفات تعداد ساقه فرعی، طول اولین میانگره، طول اولین دمبرگ و نسبت وزن خشک برگ به ساقه در سطح ۱ درصد وجود دارد (جدول ۲). از نظر مقایسه میانگین‌های صفات مورد بررسی، جمعیت همدانی بیشترین ارتفاع بوته را داشت ولی اختلاف آن با جمعیت‌های تازه کند و رهنانی معنی‌دار نبود. جمعیت یزدی از تعداد ساقه فرعی، وزن تر، وزن خشک، وزن خشک برگ و نسبت وزن خشک برگ به ساقه به ساقه بیشتری برخوردار بود و اختلاف آن با بقیه جمعیت‌ها معنی‌دار به دست آمد. جمعیت تازه کند دیم تعداد میانگره بیشتری داشت. جمعیت رهنانی به‌طور معنی‌دار عرض برگ لپه، طول برگ لپه، ارتفاع برگ لپه از خاک، طول اولین

میانگره و طول اولین دمبرگ بیشتری داشت. هرچند که جمعیت‌های اصلاح شده وزن هزاردانه، تاریخ گلدهی چین دوم، وزن تر، وزن خشک، وزن خشک ساقه، وزن خشک برگ، نسبت وزن خشک برگ به ساقه بیشتری نسبت به جمعیت‌های بومی داشتند ولی این اختلافات ناچیز بود و معنی‌دار نشد (جدول ۳). زای و موسجیدیس (Xie and Mosjidis, 1995) اظهار داشتند که ارتباط اغلب صفات گیاهیچه‌ای و صفات گیاه بالغ در شبدر قرمز ضعیف است ولی گزینش ۱۰ درصد گیاهیچه‌های برتر برای طول دمبرگ، روزهای جوانه‌زنی تا نمو کامل چهارمین برگ یا برگ‌های گیاهیچه می‌تواند علوفه خشک انفرادی گیاهان و در نهایت عملکرد سالانه را افزایش دهد. ارتباط صفات گیاهیچه‌ای با عملکرد گیاه بالغ توسط محققین متعددی گزارش شده است (Bouton, 1982; Simons, 1990; Xie and Mosjidis, 1995). در مورد بررسی‌های ایزوزیمی، نام‌گذاری ۱۱ ایزوزیم متفاوت چندشکل نشان داده شده است (شکل‌های ۱ و ۲). فراوانی ایزوزیم‌های چند شکل بر اساس امتیازهای ۱ (برای حضور) و صفر (برای عدم حضور) درج شده است (جدول ۴). ملاحظه می‌شود که ارقام بومی برای همه ۱۱ نشانگر ایزوزیمی مورد مطالعه پلی‌مورفیسم نشان دادند در حالی که ارقام اصلاح‌شده در ۱۰ نشانگر ایزوزیمی چندشکلی داشتند. همچنین فراوانی آلل‌های صفر و یک در ۶ نشانگر ایزوزیمی حالت بینابین‌تری در ارقام بومی داشتند در حالی که در ارقام اصلاح شده ۵ نشانگر فراوانی بینابین‌تری داشتند. از آنجا که همه شاخص‌های تنوع ژنتیکی مانند هتروزیگوسی مورد انتظار، شاخص شانون، تعداد آلل مؤثر، ... بر اساس فراوانی آللی است (Hartl and Clark, 1989)، بنابراین می‌توان پذیرفت که تنوع ایزوزیمی در جمعیت‌های بومی اندکی بیشتر از ارقام اصلاح شده است. ایزوزیم ۲-EST بیشترین دامنه تغییرات را از نظر فراوانی در جمعیت‌های مورد مطالعه دارا بود (جدول ۴). هتروزیگوسی مورد انتظار از طریق ضرب نی در هر جمعیت برآورد شد.

جدول ۱- تجزیه واریانس صفات مختلف در ۱۲ جمعیت یونجه

Table 1. Analysis of variance in 12 populations of alfalfa for all traits

منابع تغییرات Sources of variation	صفات Traits												
	نسبت وزن خشک برگ به ساقه (گرم) Dry weight of leaf to stem ratio (gr)	وزن خشک برگ (گرم) Dry weight of leaf (gr)	وزن خشک ساقه (گرم) Dry weight of stem (gr)	وزن خشنک (گرم) Dry weight (gr)	وزن تر (گرم) Wet weight (gr)	طول اولین دمیرگ (سانتی‌متر) First petiole length (cm)	طول اولین میان‌گره (میلی‌متر) First internode length (mm)	ارتفاع برگ لپه از خاک (میلی‌متر) Cotyledon leaf height from soil (mm)	طول برگ لپه ای (میلی‌متر) Cotyledon leaf length (mm)	عرض برگ لپه ای (میلی‌متر) Cotyledon leaf width (mm)	تعداد میانگره (عدد) Internode No.	تعداد ساقه فرعی (عدد) Accessorial stem No.	ارتفاع بوته (سانتی‌متر) Plant height (cm)
درجه آزادی تیمار Degree freedom of treatment	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
درجه آزادی خطا Degree freedom of error	355	355	355	355	355	351	390	390	390	390	358	358	359
میانگین مربعات بین جمعیت‌ها (تیمار) Mean square of treatment	0.04**	50.19**	0.49 <sup>ns</sup>	158.56**	19.46**	2.05**	675.36**	19.57**	27.01**	4.95**	5.48**	19.30**	1204.99**
میانگین مربعات داخل جمعیت‌ها (خطا) Mean square of error	0.005	13.25	0.42	42.64	3.93	0.37	236.05	7.42	2.30	0.47	2.25	4.09	122.99

برای تعداد ساقه فرعی و وزن تر تبدیل داده از نوع جذری، برای وزن خشک ساقه از نوع معکوس و برای نسبت وزن خشک برگ به ساقه از نوع ArcTan انجام شد.

The square-root transformation for wet weight and No. of auxiliary stems, the inverse transformation for dry weight and the ArcSin transformation for dry weight of leaf to stem ratio were done for mention data.

ns و \*\* به ترتیب بیانگر غیرمعنی‌دار و معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد.

ns and \*\*: non-significant and significant at 0.01, respectively.

جدول ۲- تجزیه واریانس صفات مختلف برای مقایسه جمعیت‌های بومی با جمعیت‌های اصلاح شده یونجه

Table 2. Analysis of variance for all traits to compare landrace and breeding lines populations

منابع تغییرات Sources of variation	صفات Traits												
	نسبت وزن خشک برگ به ساقه (گرم) Dry weight of leaf to stem ratio (gr)	وزن خشک برگ (گرم) Dry weight of leaf (gr)	وزن خشک ساقه (گرم) Dry weight of stem (gr)	وزن خشک (گرم) Dry weight (gr)	وزن تر (گرم) Wet weight (gr)	طول اولین دمپرگ (سانتی‌متر) First petiole length (cm)	طول اولین میان گره (میلی‌متر) First internode length (mm)	ارتفاع برگ په از خاک (میلی‌متر) Cotyledon leaf height from soil (mm)	طول برگ ای (میلی‌متر) Cotyledon leaf length (mm)	عرض برگ ای (میلی‌متر) Cotyledon leaf width (mm)	تعداد میانگره (عدد) Internode No.	تعداد ساقه فرعی (عدد) Accessorial stem No.	ارتفاع بوته (سانتی‌متر) Plant height (cm)
درجه آزادی تیمار Degree freedom of treatment	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
درجه آزادی خطا Degree freedom of error	365	365	365	365	365	361	363	400	400	400	368	369	369
میانگین مربعات بین جمعیت‌ها (تیمار) Mean square of treatment	0.04 **	47.31 ns	1.45 ns	73.94 ns	5.54 ns	2.68 **	4454.91 **	1.21 ns	5.31 ns	1.91 ns	0.54 ns	149.7 ns	149.7 ns
میانگین مربعات داخل جمعیت‌ها (خطا) Mean square of error	0.006	14.27	0.42	46.05	4.44	0.41	237.74	7.73	2.97	0.59	2.35	155.18	155.18

برای تعداد ساقه فرعی و وزن تر تبدیل داده از نوع جذری، برای وزن خشک ساقه از نوع معکوس و برای نسبت وزن خشک برگ به ساقه از نوع ArcTan انجام شد.

The square-root transformation for wet weight and No. of auxiliary stems, the inverse transformation for dry weight and ArcSin transformation were done for mention data.

ns و \*\* به ترتیب بیانگر غیرمعنی دار و معنی داری در سطح احتمال ۱ درصد.

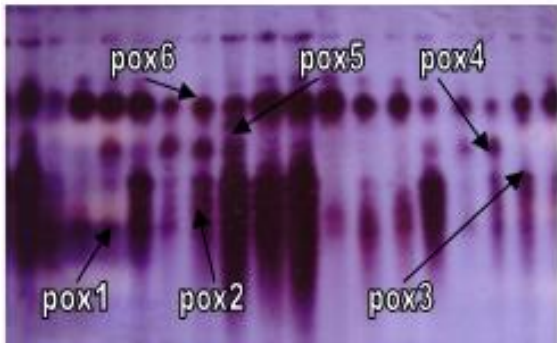
ns and \*\*: non-significant and highly significant at 0.01, respectively.

جدول ۳- میانگین صفات بررسی شده در جمعیت‌های یونجه مورد مطالعه  
Table 3. Mean of traits in all populations of alfalfa

جمعیت	Population	نسبت وزن خشک برگ به ساقه (گرم) Dry weight of leaf to stem ratio (gr)	وزن خشک برگ (گرم) Dry weight of leaf (gr)	وزن خشک ساقه (گرم) Dry weight of stem (gr)	وزن خشک (گرم) Dry weight (gr)	وزن تر (گرم) Wet weight (gr)	طول اولین دمپرگ (سانتی‌متر) First petiole length (cm)	طول اولین میان‌گره (میلی‌متر) First internode length (mm)	ارتفاع برگ لبه از خاک (میلی‌متر) Cotyledon leaf height from soil (mm)	طول برگ لبه ای (میلی‌متر) Cotyledon leaf length (mm)	عرض برگ لبه ای (میلی‌متر) Cotyledon leaf width (mm)	تعداد میانگره (عدد) Internode No.	تعداد ساقه فرعی (عدد) Accessory stem No	ارتفاع بوته (سانتی‌متر) Plant height (cm)	تاریخ گلدهی چپین دوم (روز) Flowering data 2(day)	تاریخ گلدهی چپین اول (روز) Flowering data 1 (day)	وزن هزار دانه (گرم) 1000 kernel weight (gr)
قره یونجه	Gharayonje	1.29a	3.32d	0.27a	5.21c	4.25c	1.66ab	48.65ab	6.06bc	7.41bcd	3.51bc	6.03bc	4.76de	29.49d	29b	31b	1.59j
عمو زین‌الدین	Amozeinedin	1.22cde	5.57c	0.06ab	9.95b	5.96b	1.48bc	47.31abc	5.64bc	6.93d	3.19cd	6.53bc	4.75de	41.09bc	29b	32a	1.36l
رهنانی	Rahnani	1.19de	7.11abc	0.14ab	12.94ab	6.89ab	1.94a	49.76a	8.21a	10.31a	4.54a	7.17ab	6.57ab	50.36a	29b	31b	2.80a
تازه کند دیم	Tazekand	1.19 e	6.94abc	0.02ab	12.50ab	7.04ab	1.92a	40.65abcd	6.52bc	7.33bcd	3.38bcd	7.61a	6.06bc	50.75a	29b	31b	1.45k
شازند	Shazand	1.22bcd	6.30bc	0.18ab	11.06b	6.63b	1.34bcd	42.66abcd	6.43bc	7.19cd	3.3bcd	7.03ab	5.67bcd	46.77ab	29b	31b	1.67i
همدانی	Hamedani	1.22bcde	5.85bc	0.05b	10.15ab	6.21ab	1.11d	46.43abc	6.90abc	7.81bc	3.47bc	7.09ab	5.29cde	51.28a	30a	32a	2.05e
یزدی	Yazdi	1.24a	7.94a	0.09ab	13.32a	6.53a	1.52bc	43.24abcd	6.36bc	8.06b	3.36bcd	6.94ab	7.18a	43.69bc	29b	31b	1.87h
کایساری	Kaysari	1.25cde	6.62bc	0.05b	11.25ab	6.49ab	1.57bc	41.93abcd	7.16ab	8.06b	3.53bc	6.59bc	4.32e	47.06ab	29b	31b	1.92g
رنجر	Renger	1.22bcd	6.05ab	0.13ab	10.29ab	6.55ab	1.28cd	36.36d	6.56bc	7.36bcd	3.28bcd	7.07ab	5.56bcd	43.55bc	29b	31b	2.08d
کدی	Kadi	1.29abc	6.92abc	0.00ab	11.36ab	6.76ab	1.27cd	35.65d	5.47c	7.17 cd	3.01d	6.6bc	4.97cde	43.81bc	29b	31b	1.95f
مسمیر	Mesmir	1.28a	8.68abc	0.02ab	14.13ab	7.41ab	1.30bcd	40.03bcd	6.07bc	7.82bc	3.57b	6.74abc	4.87de	43.42bc	30a	31b	2.21c
سی ریور	Sea river	1.27ab	6.20bc	0.06ab	10.29ab	6.09b	1.47bc	38.62cd	7.19ab	7.72bcd	3.63b	7.19ab	4.71de	39.65c	30a	32a	2.36b
بومی	Landraces	1.23b	6.04	0.05	10.48	6.25	1.57a	45.53a	6.59	7.86	3.54	6.91	5.75a	44.78	29.14	31.29	1.83
اصلاح شده	Improved	1.25a	6.76	0.08	11.39	6.50	1.38b	38.52b	6.49	7.63	3.40	6.84	4.89b	43.50	29.40	31.2 0	2.10

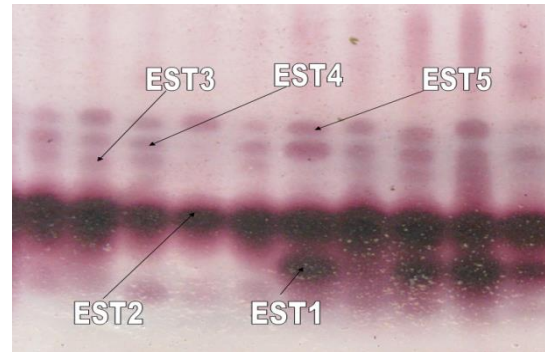
Diffrent words mean significat at 5 % probability level.

حروف متفاوت در هر ستون بیانگر اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد.



شکل ۲- نام‌گذاری ایزوزیم‌های چندشکل پراکسیداز  
Figure 2. Naming of polymorphic peroxidase isozymes

نشانه‌گر RAPD برای مطالعه‌ی تنوع ژنتیکی و صفات مورفولوژیکی در یونجه استفاده کردند و فاصله ژنتیکی در بین ارقام و جمعیت‌ها را بین ۰/۲۸ و ۰/۴۰ به دست آوردند. از نظر ارتباط نوارهای ایزوزیمی و صفات مورد بررسی در جمعیت‌های بومی، ایزوزیم EST-۱ با صفت طول اولین دمبرگ در ارتباط است و وجود این نوار باعث کاهش طول اولین دمبرگ شده است. ایزوزیم POX-۱ با صفات ارتفاع برگ لپه از خاک و نسبت وزن خشک برگ به ساقه ارتباط دارد که در رابطه با صفت ارتفاع برگ لپه از خاک وجود این نوار باعث کاهش این صفت و در رابطه با صفت نسبت وزن خشک برگ به ساقه وجود این نوار باعث افزایش این صفت شده است. ایزوزیم POX-۳ با صفت عرض برگ لپه‌ای ارتباط دارد و وجود این نوار باعث کاهش این صفت شده است. ایزوزیم POX-۵ با صفت تعداد میانگره ارتباط دارد و وجود این نوار باعث افزایش این صفت شده است. سایر نوارها ارتباط معنی‌داری با صفات نشان ندادند. در مورد جمعیت‌های اصلاح شده ایزوزیم EST-۱ با صفت تعداد ساقه فرعی ارتباط دارد و وجود این نوار باعث افزایش این صفت شده است. ایزوزیم POX-۲ با صفت وزن خشک برگ ارتباط معنی‌داری دارد و وجود این نوار باعث افزایش این صفت شده است. ایزوزیم POX-۳ با صفت تعداد ساقه فرعی ارتباط معنی‌دار داشت و وجود این نوار باعث کاهش این صفت شده است. ایزوزیم POX-۴ با صفات ارتفاع بوته، تعداد میانگره، وزن تر بوته، وزن خشک بوته، وزن خشک ساقه و وزن خشک برگ ارتباط نشان داد و در همه موارد وجود نوار باعث افزایش این صفات شد.



شکل ۱- نام‌گذاری ایزوزیم‌های چند شکل استراز  
Figure 1. Naming of polymorphic esterase isozymes

و میانگین شاخص‌های تنوع ژنتیکی به دست آمد و نتایج نشان داد که رقم کدی شاخص‌های تنوع بالاتری نسبت به ارقام دیگر داشت. جمعیت‌های اصلاح شده با دارا بودن مقدار ۰/۵۱۹ برای شاخص شانون و مقدار ۰/۳۵۲ برای تنوع ژنتیکی نی، تفاوت چشمگیری نسبت به جمعیت‌های بومی نشان ندادند. می‌توان نتیجه گرفت این دو نوع جمعیت تفاوت قابل توجهی با یکدیگر نداشتند (جدول ۵). ولیزاده و همکاران (Valizadeh *et al.*, 2011) برای بررسی تنوع درون و بین ارقام یونجه از الکتروفورز آنزیم‌ها استفاده کردند، پنج سیستم آنزیمی و حدود ۱۰۰ گیاهچه ۱۰ روزه را مورد بررسی قرار دادند که سه مکان ژنی ایزوزیم تشخیص داده شد و سطح بالایی از هتروزیگوسی (بین ۰/۵۲۱ تا ۰/۶۹۹) را در درون جمعیت‌های یونجه به دست آوردند. منگونی و همکاران (Mengoni *et al.*, 2000) سطح بالایی از تنوع را درون و بین جمعیت‌های یونجه زراعی به وسیله نشانگرهای SSR و RAPD شناسایی کردند، آن‌ها دلیل این تنوع را دگرگرده‌افشانی و ساختار تتراپلوئیدی یونجه ذکر کردند. فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها از طریق فرمول نی محاسبه شد که کمترین فاصله متعلق به ارقام تازه کند دیم و قره یونجه است و بیشترین فاصله متعلق به ارقام یزدی و کدی است. در کل می‌توان فاصله ژنتیکی بسیار پایین بین ارقام و جمعیت‌های یونجه را به ساختار ژنتیکی بسیار هتروزیگوت و وراثت تتراسومیک یونجه نسبت داد. فاصله ژنتیکی ارقام اصلاح شده و بومی نیز ۱ درصد بود، بنابراین ارقام بومی و اصلاح شده حدود ۹۹ درصد به یکدیگر شباهت دارند (جدول ۶). توکاک و همکاران (Tucak *et al.*, 2008) از



جدول ۴- فراوانی ایزوزیم‌ها در جمعیت‌های یونجه

Table 4. Frequency of isozymes in alfalfa populations

میانگین Mean	اصلاح شده Improved	بومی Landraces	سی ریور Sea river	مسمیر Mesmir	کدی Kadi	رنجر Renger	کایساری Kaysari	یزدی Yazdi	همدانی Hamedani	شازند Shazand	تازه کند Tazekand	رهنانی Rahnani	عمو زین‌الدین Amozeinedin	قره یونجه Gharayonje	ایزوزیم‌ها Isozymes	
0.81	0.78	0.83	0.90	0.83	0.74	0.75	0.79	0.86	0.71	0.77	0.88	0.78	0.84	0.85	0	EST1
0.19	0.22	0.17	0.10	0.17	0.26	0.25	0.21	0.14	0.29	0.23	0.12	0.22	0.16	0.15	1	
0.02	0.00	0.01	0.05	0.00	0.14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.06	0.00	0	EST2
0.98	1.00	0.99	0.95	1.00	0.86	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.94	1.00	1	
0.64	0.53	0.66	0.85	0.90	0.52	0.41	0.66	0.71	0.32	0.42	0.67	0.71	0.73	0.74	0	EST3
0.36	0.47	0.34	0.15	0.10	0.48	0.59	0.34	0.29	0.68	0.58	0.33	0.29	0.27	0.26	1	
0.44	0.56	0.48	0.58	0.30	0.37	0.24	0.35	0.38	0.67	0.54	0.47	0.47	0.34	0.52	0	EST4
0.56	0.44	0.52	0.42	0.70	0.63	0.76	0.65	0.62	0.33	0.46	0.53	0.53	0.66	0.48	1	
0.68	0.63	0.70	0.58	0.64	0.74	0.75	0.83	0.46	0.74	0.84	0.71	0.67	0.64	0.60	0	EST5
0.32	0.37	0.30	0.42	0.36	0.26	0.25	0.17	0.54	0.26	0.16	0.29	0.33	0.36	0.40	1	
0.47	0.36	0.47	0.58	0.42	0.60	0.37	0.67	0.38	0.36	0.62	0.35	0.52	0.52	0.20	0	PRX1
0.53	0.64	0.53	0.42	0.58	0.40	0.63	0.33	0.62	0.64	0.38	0.65	0.48	0.48	0.80	1	
0.58	0.60	0.58	0.65	0.63	0.56	0.56	0.48	0.53	0.63	0.44	0.65	0.48	0.60	0.71	0	PRX2
0.42	0.40	0.42	0.35	0.37	0.44	0.44	0.52	0.47	0.37	0.56	0.35	0.52	0.40	0.29	1	
0.80	0.73	0.83	0.79	0.72	0.90	0.85	0.77	0.76	0.72	0.88	0.84	0.88	0.74	0.76	0	PRX3
0.20	0.27	0.17	0.21	0.28	0.10	0.15	0.23	0.24	0.28	0.12	0.16	0.12	0.26	0.24	1	
0.59	0.60	0.57	0.58	0.59	0.85	0.52	0.64	0.38	0.69	0.62	0.61	0.56	0.48	0.58	0	PRX4
0.41	0.40	0.43	0.42	0.41	0.15	0.48	0.36	0.62	0.31	0.38	0.39	0.44	0.52	0.42	1	
0.88	0.92	0.91	0.87	0.86	0.80	0.83	0.88	0.93	0.91	0.98	0.87	0.85	0.95	0.89	0	PRX5
0.12	0.08	0.09	0.13	0.14	0.20	0.17	0.12	0.07	0.09	0.02	0.13	0.15	0.05	0.11	1	
0.03	0.06	0.01	0.21	0.00	0.05	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.09	0.00	0	PRX6
0.97	0.94	0.99	0.79	1.00	0.95	0.95	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.91	1.00	1	

جدول ۵- میانگین شاخص‌های تنوع ژنتیکی کلیه‌ی جمعیت‌های یونجه از لحاظ تمام ایزوزیم‌ها  
Table 5. Means of genetic diversity indices for all isozymes in all populations of alfalfa

ژرم پلاسما Germplasm	جمعیت Population	تعداد نمونه No. of samples	تعداد آل‌های مؤثر No. of effective alleles	تنوع ژنتیکی نی Nei's genetic diversity	شاخص شانون Shanon index
بومی landraces	قره یونجه Gharayonje	23	1.5299 ± 0.3569	0.3090 ± 0.1800	0.4584 ± 0.2508
	عمو زین‌الدین Amozeinedin	20	1.6744 ± 0.2804	0.3846 ± 0.1220	0.5647 ± 0.1477
	رهنانی Rahnani	20	1.5985 ± 0.3950	0.3320 ± 0.1923	0.4830 ± 0.2638
	تازه کند دیم Tazekand	21	1.5472 ± 0.3693	0.3139 ± 0.1858	0.4631 ± 0.2566
	شازند Shazand	22	1.5369 ± 0.4161	0.2991 ± 0.2070	0.4386 ± 0.2828
	همدانی Hamedani	22	1.5665 ± 0.3338	0.3268 ± 0.1812	0.4784 ± 0.2557
	یزدی Yazdi	14	1.5836 ± 0.3937	0.3247 ± 0.1963	0.4733 ± 0.2687
اصلاح شده Improved	کایساری Kaysari	19	1.5455 ± 0.3478	0.3170 ± 0.1790	0.4679 ± 0.2508
	رنجر Renger	20	1.6183 ± 0.3088	0.3576 ± 0.1453	0.5265 ± 0.1973
	کدی Kadi	22	1.6736 ± 0.2704	0.3869 ± 0.1075	0.5700 ± 0.1223
	مسمیر Mesmir	23	1.5408 ± 0.3677	0.3112 ± 0.1861	0.4597 ± 0.2570
	سی ریور Sea river	23	1.6847 ± 0.3064	0.3866 ± 0.1206	0.5684 ± 0.1361
	بومی Landraces	20	1.577 ± 0.364	0.327 ± 0.181	0.48 ± 0.247
اصلاح شده Improved	21	1.612 ± 0.872	0.352 ± 0.148	0.519 ± 0.193	

جدول ۶- فاصله ژنتیکی نی از طریق داده‌های ایزوزیمی در جمعیت‌های یونجه  
Table 6. Nei's genetic distance based on isozyme data in all populations of alfalfa

جمعیت Population	قره یونجه Gharayonje	عمو زین‌الدین Amozeinedin	رهنانی Rahnani	تازه کند Tazekand	شازند Shazand	همدانی Hamedani	یزدی Yazdi	کایساری Kaysari	رنجر Renger	کدی Kadi	مسمیر Mesmir
عمو زین‌الدین Amozeinedin	0.036										
رهنانی Rahnani	0.025	0.025									
تازه کند دیم Tazekand	0.007	0.027	0.010								
شازند Shazand	0.050	0.030	0.011	0.024							
همدانی Hamedani	0.058	0.049	0.020	0.030	0.016						
یزدی Yazdi	0.046	0.036	0.033	0.028	0.035	0.035					
کایساری Kaysari	0.081	0.042	0.048	0.052	0.041	0.046	0.049				
رنجر Renger	0.039	0.070	0.041	0.029	0.050	0.024	0.042	0.065			
کدی Kadi	0.018	0.023	0.017	0.015	0.026	0.061	0.047	0.070	0.072		
مسمیر Mesmir	0.019	0.024	0.018	0.020	0.041	0.055	0.040	0.091	0.062	0.018	
سی ریور Sea river	0.058	0.024	0.050	0.052	0.065	0.083	0.079	0.058	0.099	0.052	0.061
بومی در مقابل اصلاح شده Landraces vs. Improved	0.010										

جدول ۷- ارتباط معنی‌دار بین میانگین صفات بررسی شده و نوارهای آنزیمی در جمعیت‌های بومی و اصلاح شده  
 Table 7. Significant relation between mean of traits and enzymes bands in landraces and improved populations

جمعیت Population	ایزوزیم‌ها Isozymes	صفات / Traits																						
		نسبت وزن خشک برگ به ساقه (گرم)	Dry weight of leaf to stem ratio (gr)	وزن خشک برگ (گرم)	Dry weight of leaf (gr)	وزن خشک ساقه (گرم)	Dry weight of stem (gr)	وزن خشک (گرم)	Dry weight (gr)	وزن تر (گرم)	Wet weight (gr)	طول اولین دمبرگ (سانتی‌متر)	First petiole length (cm)	ارتفاع برگ به از خاک (میلی‌متر)	Cotyledon leaf height from soil (mm)	عرض برگ به ای (میلی‌متر)	Cotyledon leaf width (mm)	تعداد میانگره (عدد)	Internode No.	تعداد ساقه فرعی (عدد)	Accessory stem No.	ارتفاع بوته (سانتی‌متر)	Plant height (cm)	
بومی Landrace	EST-1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	1.65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		1	-	-	-	-	-	-	-	-	1.31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	pox-1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.94	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6.74	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	pox-3	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.7	-	-	-	-	-	-	-	-	
		1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	pox-5	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6.88	-	-	-	-	-	-	
		1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7.54	-	-	-	-	-	-	
	اصلاح شده Improved	EST-1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.59	-	-	-	-
			1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5.37	-	-	-	-
pox-2		0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.38	
		1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.47	
pox-3		0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5.21	-	-	-	-
		1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.34	-	-	-	-
pox-4		0	41.45	-	-	-	-	-	-	-	4.18	2.06	1.31	0.37	-	-	-	-	6.47	-	-	-	-	-
		1	45.49	-	-	-	-	-	-	-	4.73	2.38	1.51	0.49	-	-	-	-	7.19	-	-	-	-	-

-: No significant different.

-: عدم وجود اختلاف معنی‌دار.

No significant different in cotyledon leaf length and first internode length traits for all strips.

برای صفات طول برگ لپه‌ای و طول اولین میان‌گره عدم وجود اختلاف معنی‌دار در کلیه نوارها.

EST, ACP, GOT, LAP, MDH و PGI پلی‌مورفیسم نشان دادند، رابطه صفات زراعی و مورفولوژیکی با نشانگرهای آنزیمی بررسی گردید، در این بررسی معلوم شد که فقط مکان ژنی GOT-۲ همبستگی مثبت و معنی‌داری با برخی از صفات زراعی مانند طول برگچه، تعداد ماریچ‌های نیام و وزن هزاردانه دارد. ون و جین ( Van-Xuan and Jin, 2011) در بررسی ارتباط بین صفات زراعی و آنزیم استراز در نسل F<sub>2</sub> حاصل از تلاقی دو رقم برنج، تعدادی آنزیم مرتبط با صفات عملکرد و اجزای عملکرد در برنج گزارش کردند. سینق و همکاران (Singh et al., 2009) گزارش کردند که حرکت نسبی نوارهای پراکسیداز و استراز با ارتفاع بوته در ارتباط است.

سایر نوارها ارتباط معنی‌داری با صفات نشان ندادند. همان‌طور که مشاهده می‌شود برخی نوارهای آنزیم استراز با صفات ظاهری گیاه نظیر طول اولین دمبرگ و تعداد ساقه فرعی ارتباط دارند در حالی که برخی نوارهای آنزیم پراکسیداز با صفات مرتبط با عملکرد نظیر وزن تر، وزن خشک، و وزن خشک ساقه،... ارتباط دارند. از این ارتباط می‌توان نتیجه گرفت گیاهانی که آنزیم پراکسیداز بالایی دارند عملکرد بالایی دارند (جدول ۷). بولیتا و همکاران (Bullitta et al., 1994) ۴۵ نمونه از ژرم پلاسما *Medicago polymorpha* L. را از نظر تنوع در صفات مورفولوژیکی، آگرونومیکی و بیوشیمیایی مورد بررسی قرار دادند. تنوع ژنتیکی این ۴۵ جمعیت با ۱۲ سیستم آنزیمی مختلف با ژل نشاسته مورد مطالعه قرار گرفت. ۷ مکان ژنی مربوط به

## References

- Abdollahi, B.** (2013). Study of genetic diversity in some populations of cultivated alfalfa (*Medicago sativa* L.) using morphological traits. *Modern Genetic*, **7**: 381-388 (In Persian).
- Bouton, J.** (1982). Seedling characteristics to predict yield and total N of mature alfalfa plants. *Crop Science*, **22**: 128-130.
- Bullitta, S., Floris, R., Hayward, M., Loi, A., Porqueddu, C. and Veronesi, F.** (1994). Morphological and biochemical variation in Sardinian populations of *Medicago polymorpha* L. suitable for rainfed Mediterranean conditions. *Euphytica*, **77**: 263-268.
- Clegg, M.** (1997). Plant Genetic Diversity and the Struggle to Measure Selection. *Journal of Heredity*, **88**: 1-7.
- Corts, M.M. and Martinez, M.C.** (2000). Variation of PGM and IDH isozymes for identification of alfalfa varieties. *Euphytica*, **112**: 137-143.
- Hartl, D.L. and Clark, A.G.** (1989). *Principles of population genetics*, 2<sup>nd</sup> edn, Sinauer associates, Massachusetts, USA.
- Hedrick, P.W.** (2005). *Genetics of populations*, 3<sup>th</sup> edn, Jones and Bartlett Publishers, Massachusetts, USA.
- Kaljung, K. and Jaaska, V.** (2010). No loss of genetic diversity in small and isolated populations of "*Medicago sativa*" subsp. *falcata*". *Biochemical Systematics and Ecology*, **38**: 510-520.
- Labdi, M., Robertson, L., Singh, K. and Charrier, A.** (1996). Genetic diversity and phylogenetic relationships among the annual Cicer species as revealed by isozyme polymorphism. *Euphytica*, **88**: 181-188.
- Lamkey, K. and Lee, M.** (1993). Quantitative genetics, molecular markers, and plant improvement. Paper presented at the *Focused plant improvement: Towards responsible and sustainable agriculture Proc 10<sup>th</sup> Australian Plant Breeding Conf, Gold Coast*.
- McCoy, T.J. and Bingham, E.T.** (1988). Cytology and cytogenetics of alfalfa In: *Alfalfa and Alfalfa improvement* (Hanson, A., Barnes, D. and Hill, R., Eds.) pp. 737-776, Agron, Monograph 29, Madison, USA.
- 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**: 311-317.

- Michaud, R., Lehman, W. and Rumbaugh, M.** (1988). World distribution and historical development In: *Alfalfa and alfalfa improvement* (Hanson, A., Barnes, D. and Hill, R., Eds.) pp. 25-91, Agron, Monograph 29, Madison, USA.
- Nei, M.** (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **70**: 3321-3323.
- Oleson, B.** (1994). World wheat production, utilization and trade In: *Wheat Production, Properties and Quality* (Bushuk, W. and Rasper, V. F., Eds.) pp. 1-11, Springer, Chapman and Hall, London, UK.
- Quiros, C.F.** (1980). Identification of alfalfa plants by enzyme electrophoresis. *Crop science*, **20**: 262-264.
- Simons, R.** (1990). Relationships between seedling traits and mature plant yield in alfalfa. *Canadian Journal of Plant Science*, **69**: 206-213.
- Singh, A.K., Mishra, A. and Shukla, A.** (2009). Genetic assessment of traits and genetic relationship in blackgram (*Vigna mungo*) revealed by isoenzymes. *Biochemical Genetics*, **47**: 471-485.
- Soltis, D.E. and Soltis, P.S.** (1990). *Isozymes in plant biology*, Springer, Chapman and Hall, London, UK.
- Tucak, M., Popovic, S., Cupic, T., Grljusic, S., Bolaric, S. and Kozumplik, V.** (2008). Genetic diversity of alfalfa (*Medicago spp.*) estimated by molecular markers and morphological characters. *Periodicum Biologorum*, **110**: 243-249.
- Valizadeh, M., Mohayeji, M., Yasinzadeh, N., Nasrullazadeh, S. and Moghadam, M.** (2011). Genetic diversity of synthetic alfalfa generations and cultivars using tetrasomic inherited allozyme markers. *Journal of Agricultural Science and Technology*, **13**: 425-430.
- Van-Xuan, D. and Jin, I.D.** (2011). Relationship between esterase isozymes and some agronomic traits in F2 populations derived from the crossing of Milyang 23 and Ashahi. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, **14**: 11-15.
- Veronesi, F., Brummer, E.C. and Huyghe, C.** (2010). Alfalfa In: *Handbook of plant breeding: Fodder Crops and Amenity Grasses* (Boller, B., Posselt, U.K. and Veronesi, F., Eds.) pp. 395-437, Springer, New York, USA.
- Veronesi, F., Rosellini, D. and Albertini, E.** (2003). The use of molecular markers in alfalfa breeding. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, **39**: 104-111.
- Xie, C. and Mosjidis, J.** (1995). Seedling-selection effects on morphological traits of mature plants in red clover. *Theoretical and Applied Genetics*, **91**: 1032-1036.
- Yeh, F., Yang, R. and Boyle, T.** (1999). POPGENE VERSION 1.31: Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis, University of Alberta. *Edmonton Journal, AB, Canada*.
- Zeidler, M.** (2000). Electrophoretic analysis of plant isozymes. *Biologica*, **38**: 7-16.

## Investigation of Esterase and Peroxidase Isozymes in Improved and Iranian Landraces of Alfalfa and Their Relationships with Agronomic and Morphological Traits

Maryam Ahmadi<sup>1</sup>, Mustafa Valizadeh<sup>2,\*</sup>, Mahmoud Turchi<sup>2</sup>, Mohammad Moghaddam Vahed<sup>2</sup> and Hossein Mohammadzadeh Jalaly<sup>1</sup>

- 1- Former M.Sc. Student, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Agriculture Faculty, University of Tabriz, Tabriz
- 2- Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Agriculture Faculty, University of Tabriz, Tabriz

(Received: December 26, 2013 – Accepted: March 15, 2014)

### Abstract

For evaluation of genetic diversity among improved alfalfa varieties and Iranian landraces, 12 populations including five improved varieties (Kaysari, Kadi, Ranger, Mesmir, Seariver) and seven landraces (Gharayonje, Amozeynadin, Rahnani, Tazekand, Shazand, Hamedani, Yazdi) were evaluated using agronomic traits and enzyme markers. Thirty-five individuals of each variety were grown and analyzed in separate pots in a unbalanced completely randomized design (CRD). Analysis of variance for agronomic traits showed significant differences for most of the traits among improved and landrace varieties. For esterase and peroxidase enzymes based on presence or absence of enzyme bands (1, 0) eleven polymorphic isozyme bands were detected. For improved and landrace varieties Shannon index mean was  $0.48 \pm 0.246$  and  $0.519 \pm 0.193$ , respectively, furthermore Nei genetic diversity index mean for improved and landraces was  $0.327 \pm 0.181$  and  $0.352 \pm 0.148$  respectively, suggesting no difference between improved and landrace varieties was found. Analysis of relation between isozyme markers and agronomic traits showed that there are significant differences between the presence of POX-4 and wet and dry yield in improved varieties.

**Keywords:** Alfalfa, Genetic diversity, Isozyme markers, Polymorphism.

---

\* Corresponding Author, E-mail: mvalizadeh@tabrizu.ac.ir