

شناسایی مولکولی توده‌های بذری با استفاده از نمونه‌های بالک بذر: مطالعه موردی بر روی توده‌های بذری گیاه یونجه زراعی

مجتبی خیام نکویی*

دانشیار دانشکده علوم زیستی دانشگاه تربیت مدرس

*صندوق پستی ۱۵۴-۱۴۱۱۵، تهران، ایران

khayam@modares.ac.ir

پذیرش: ۱۴۰۳/۰۹/۰۵

دریافت: ۱۴۰۳/۴۳/۱۹

چکیده

ایران یکی از مهم‌ترین مراکز تنوع ژنتیکی گیاه یونجه در جهان می‌باشد و انواع مختلفی از آن در کشور وجود دارد. تأیید اصالت توده‌ها و ارقام یونجه از این لحاظ که تنوع ژنتیکی در این گیاه می‌تواند تأثیر مستقیمی بر عملکرد و کیفیت علوفه و بذر داشته باشد، از اهمیت ویژه‌ای برای کشاورزان و تولیدکنندگان بذر برخوردار است. در این راستا در مطالعه حاضر، توسعه روشی برای شناسایی و تفکیک مهمترین توده‌های یونجه زراعی ایران به وسیله نشانگرهای ریزماهواره مورد توجه قرار گرفت. برای تسهیل تمایز و تفکیک توده‌های یونجه مورد نظر، آلل‌های اختصاصی و یا به عبارت بهتر ژنوتیپ آللی اختصاصی برای هر توده شناسایی شد. بدین منظور از نمونه‌های تصادفی حاوی ۱۰۰ بذر از هر توده استفاده شد که در نهایت از طریق ۹ جایگاه ریزماهواره با استفاده از ژنوتیپ آللی اختصاصی شناسایی شده برای هر توده به وضوح تفکیک شدند. بیشترین قابلیت تفکیک متعلق به نشانگرهای MTIC233، BI90، ACT009، TC7، MTIC183، MS30، MTIC238 و AFCA11 بود. دورترین فاصله ژنتیکی مربوط به توده‌های 5-B و خارجی و همچنین توده‌های 29-N و خارجی و نزدیک‌ترین فاصله مربوط به توده‌های 27-G، 9-H و 21-R بود. با توجه به نتایج حاصل به نظر می‌رسد توده‌های 9-H، 21-R، 27-G، 25-B، 5-B و 2-G دارای زمینه ژنتیکی مشترک و با شباهت بیشتری نسبت به بقیه توده‌ها می‌باشند. روش پیشنهادی در این مطالعه به سادگی و در مدت کوتاه (یک تا دو روز) امکان شناسایی توده یونجه مورد نظر را بدون نیاز به استخراج DNA از برگ فراهم می‌کند.

کلید واژگان: یونجه، شناسایی، ریزماهواره، توده بذری، نشانگر مولکولی، اصالت

۱- مقدمه

یونجه زراعی (*Medicago sativa*) پس از غلات، مهم‌ترین محصول اقتصادی و استراتژیک دنیا محسوب می‌شود. خاستگاه این گیاه خاور نزدیک، آسیای صغیر، قفقاز، شمال ترکیه، ترکمنستان و شمال غرب ایران است [۱]. بر اساس گزارش وزارت جهاد کشاورزی، در میان کشورهای تولیدکننده یونجه، ایران در رده هشتم جهانی قرار دارد و طی سال زراعی ۱۴۰۱-۱۴۰۰، سطح زیر کشت دیم و آبی یونجه ۶۴۸/۰۲۲ هکتار، میزان تولید آن ۴,۷۷۶,۰۶۰ تن و مجموع عملکرد (کشت آبی و دیم) آن ۱۳,۱۰۲ کیلوگرم در هکتار بوده است [۲]. از لحاظ گیاه‌شناسی، جنس *Medicago* متعلق به خانواده *Fabaceae* بوده و دارای ۵۶ گونه مختلف می‌باشد که ۲۲ گونه آن چند ساله آلوگام (دگرگشن) و ۳۴ گونه آن یک ساله آتوگام (خودگشن) است. گونه‌های یونجه عموماً آلوگام بوده و بین ۷۲ تا ۸۷ درصد دگرگشن می‌باشند [۳] که این میزان بسته به شرایط محیطی، ژنوتیپ گیاه و میزان فعالیت حشرات در مزرعه یونجه متغیر می‌باشد [۴]. از جمله این گونه‌های آلوگام می‌توان به *M. sativa* اشاره کرد که در دو سطح پلوئیدی، دیپلوئید ($2n=2x=16$) و اتوتتراپلوئید ($2n=4x=32$) وجود دارد. تعداد کروموزم‌های پایه در گونه‌های مختلف یونجه $x=8$ می‌باشد و اندازه ژنوم آن حدود ۸۰۰-۱۰۰۰ مگا جفت باز می‌باشد [۵]. گیاه یونجه به دلیل گرده‌افشانی باز و میزان بالای دگرگشتی (که بر حسب ژنوتیپ و شرایط محیطی متغیر است) هتروزیگوسیتی بسیار بالایی دارد، از این رو تنوع ژنتیکی زیادی در بین ارقام آن مشاهده می‌شود [۶]. چنین تنوع ژنتیکی به‌طور طبیعی در گیاهان داخل یک توده یونجه که در اقلیم‌های مختلف جغرافیایی رشد می‌کنند، نیز وجود دارد [۷]. وجود چنین اختلاف ژنتیکی گسترده در بین افراد جمعیت یونجه که به دلیل دگرگشتی و تتراپلوئید بودن آن اتفاق می‌افتد، مطالعات مربوط به ژنتیک جمعیت این محصول را پیچیده‌تر نموده است و به

همین دلیل پیدا کردن اطلاعات لازم در مورد تنوع ژرم پلاسما ارقام مختلف، مخصوصاً هنگامی که از منابع مختلف جمع‌آوری شده باشند، اهمیت ویژه‌ای دارد [۸]. با توجه به ژرم پلاسما غنی یونجه در ایران و وجود ارقام بومی در کشور، بررسی و تعیین میزان تنوع ژنتیکی آن‌ها با استفاده از روش‌های مولکولی ضروری به‌نظر می‌رسد. نشانگرهای مولکولی مختلف ممکن است از نظر ویژگی‌های مهمی مانند فراوانی ژنومی، سطح چندشکلی مشاهده شده، اختصاصی بودن جایگاه ژنی، تکرارپذیری، ملزومات تکنیکی و هزینه اجرا با یکدیگر متفاوت باشند. از این رو، درک بهتر کارایی نشانگرهای DNA مختلف پیش‌نیاز کاربرد مؤثر این نشانگرها در برنامه‌های به‌نژادی و شناسایی ارقام می‌باشد [۹]. تاکنون سیستم‌های نشانگر مولکولی متنوعی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی، شناسایی ارقام و کارایی هیبریدها در یونجه از قبیل RFLP [۱۰]، RAPD [۱۱]، SSR [۱۲، ۱۳]، AFLP [۱۴]، IRAP و REMAP [۱۵] مورد استفاده قرار گرفته‌اند. علی‌رغم سودمندی روش‌های فوق‌الذکر برای تفکیک تفاوت‌های ژنتیکی توده‌های یونجه، از جمله معایب برخی از این روش‌ها می‌توان به هزینه بالا، تکرارپذیری پایین و پیچیدگی مراحل اجرایی آنها اشاره کرد [۱۶]. در این میان، نشانگرهای ریزماهواره به دلیل سرعت و دقت بالا، ماهیت همبازی، سهولت مراحل کار، چندشکلی قابل توجه، امتیازبندی آسان، مکان ژنومی مشخص و تکرارپذیری بالا، ابزار مولکولی قدرتمند و مؤثری برای ارزیابی تنوع ژنتیکی و توصیف ژرم پلاسما در یونجه‌های تتراپلوئید می‌باشند [۷، ۸]. طی پژوهش‌های پیشین، استفاده از نشانگرهای ریزماهواره برای تعیین میزان تنوع ژنتیکی، شناسایی و تفکیک ارقام، مدیریت مجموعه‌های ذخایر توارثی، مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده صفات مهم در ژنوم یونجه، شناسایی ژن‌های انتقال یافته به نتاج در تلاقی‌های بین گونه‌ای و انتخاب به کمک نشانگر در جمعیت‌های مختلف یونجه‌ای

زراعی برای آگاهی از وضعیت ژنتیکی این ذخایر توارثی با هدف به دست آوردن حداکثر هتروزیس در برنامه های اصلاحی و تهیه ی ارقام برتر، مورد توجه قرار گرفته است [۷-۲۰ و ۱۷-۱۱].

نشانگرهای ریزماهواره را می توان به وفور هم در توالی های ژنومی DNA و cDNA پیدا کرد [۲۱]. ریزماهواره های به دست آمده از کتابخانه های ژنومی با توجه به فراوانی بالای آنها در ژنوم، تکرارپذیری بالا و چندشکلی قابل توجه معمولاً بیشتر قابل اطمینان و مورد توجه هستند. این ریزماهواره ها معمولاً قطعات بیشتری را تکثیر کرده و چندشکلی بیشتری نشان می دهند [۲۴-۲۲]. با این وجود، بسیاری از نشانگرهای ژنومی احتمالاً لینکاژ نزدیکی با نواحی بیان شده نداشته و بنابراین عملکرد ژنی مشخصی ندارند [۲۵]. از سوی دیگر، EST-SSRهای به دست آمده از توالی های EST از نظر عملکردی نسبت به نشانگرهای ژنومی DNA، به دلیل حضور آنها در نواحی بیان شده ی ژنوم و منعکس کردن تنوع ژنتیکی درون و اطراف این ژن ها و دسترسی سریع به آنها در پایگاه های داده از اهمیت بیشتری برخوردار هستند. EST-SSRها منبع مهمی برای اکتشاف ژن های جدید، بیان ژن، توسعه نشانگرهای مولکولی و ژنومیکس تطبیقی می باشند [۲۱]. این نوع ریزماهواره ها به دلیل داشتن ضریب یکسانی پایین، قدرت تفکیک بسیار بالایی دارند و چون مستقیماً چند شکلی را در مناطق رونویسی شده نشان می دهند، در نتیجه تخمین دقیق تری از تنوع عملکردی را فراهم می کنند که احتمالاً در برنامه های اصلاح نباتات و بررسی منابع ژنتیکی ارزش بیشتری خواهند داشت [۲۷ و ۲۶].

از آنجایی که تعیین اصالت بذر یونجه در درجه اول و همچنین ارزیابی میزان خلوص بذور در هر توده با توجه به تأثیر مستقیم آن بر عملکرد در واحد سطح و همچنین ناهمگنی توده ها و تأثیر متعاقب آن بر هزینه های کشت و کار از اهمیت ویژه ای برخوردار است، بنابراین در این

پژوهش، نشانگرهای مولکولی ریزماهواره با هدف شناسایی و تفکیک مولکولی توده های مورد نظر یونجه کشور و نیز بررسی تنوع ژنتیکی بین این توده ها مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی اولیه تنوع درون توده ها، نمونه هایی از هر توده مورد بررسی های مولکولی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان دهنده وجود تنوع درون توده ای بسیار زیاد در داخل تمامی توده های مورد بررسی بود که بدین ترتیب هم به این دلیل و هم به دلیل ایجاد سهولت و تسریع در شناسایی و تعیین اصالت توده بذری مورد نظر تصمیم بر استفاده از بذر و DNA حاصل از آن شد. چرا که استفاده از برگ مستلزم طی زمان حداقل ۲-۳ هفته ای برای کشت و رسیدن به مرحله رشدی مناسب دانهال برای استخراج DNA می باشد.

۲- مواد و روش ها

۲-۱ مواد گیاهی، روش نمونه برداری، محل نمونه

برداری، تهیه و تأیید نمونه ها

تعداد ۱۰ توده که بیش از ۹۵ درصد تولید و تجارت یونجه در کشور را در بر می گیرند انتخاب و در مطالعات بعدی استفاده شدند.

بذر توده های رفرنس مورد نظر توسط شرکت پاکان بذر با کدهای اختصاصی تامین شد (2-G، 5-B، 9-H، 21-R، Fm، 25-B، 26-Y، 27-G و 29-N به ترتیب از استان های قم، اصفهان، همدان، اصفهان، اصفهان، کرمان، یزد، آذربایجان شرقی و سیستان و بلوچستان). با در نظر گرفتن این موضوع که بایستی مراحل شناسایی توده ها در کمترین زمان ممکن انجام گردد، استفاده از مخلوط ۱۰۰ بذر به صورت تصادفی به عنوان نماینده هر توده و استخراج DNA از مجموع ۱۰۰ بذر به صورت هم زمان و استفاده از آن به عنوان الگو در واکنش زنجیره ای پلیمرز مد نظر قرار گرفت.

۲-۲ ژنوتایپینگ با استفاده از نشانگرهای SSR

۲-۲-۱ انتخاب نشانگر

با توجه به اطلاعات نشانگرهای SSR موجود مورد استفاده در مطالعات پیشین از این منابع برای بررسی ژرم‌پلاسِم مورد نظر استفاده شد. در این خصوص نشانگرهای SSR که بیشترین میزان چند شکلی را از خود نشان داده بودند غربال شده و مورد استفاده قرار گرفتند [۳۰-۲۸ و ۱۳] (جدول ۱).

جدول ۱ مشخصات آغازگرهای ریزماهواره مورد استفاده.

نام آغازگر	توالی (۵ به ۳)	اندازه (nt)	Tm	موتیف اصلی	دامنه آلی (bp)	کد بانک ژن	منبع
AA05-F	CCTTCTGCCATTCAATTCACCTT	22	53.9	(A)9:(CAA)3:(AT) ₃	286	CU179904.1	[12]
AA05-R	CTTCAAAGGGTCATCAAATCAC	22	52.4				
ACT-009-F	AAGCAACCGAACAACGATTT	20	53.9	(GA)27	468- 565	CR962126.2	[30]
ACT-009-R	AGTGACAGTTATGGGGGTGG	20	55.9				
AFC1-F	CCCATCATCAACATTTTCA	19	48	(CTT)3	103	OX326969.1	[7]
AFC1-R	TTGTGGATTGGAACGAGT	18	51				
AFCa11-F	CTTGAGGGAACTATTGTTGAGT	22	52	(CA)11	139-188	OX326966.1	[7]
AFCa11-R	AACGTTTCCCAAACATACTT	21	51				
AFCT11-F	GGACAGAGCAAAAAGAACAAT	20	51.1	(CT)12	186-196	OX326965.1	[7]
AFCT11-R	TTGTGTGGAAAGAATAGGAA	20	48.9				
AFCT32-F	TTTTTGTCCACCTCATTAG	20	50.1	(CT)14	100	CU651599.5	[7]
AFCT32-R	TTGGTTAGATTCAAAGGGTTAC	22	50.7				
AFCT45-F	TAAAAAACGGAAGAGTTGGTTAG	24	52.3	(CT)8 AT (CT)3	127	OY283140.1	[7]
AFCT45-R	GCCATCTTTCTTTTGCTTC	20	50.8				
AFCTT1-F	CCCATCATCAACATTTTCA	19	48.1	(CTT)9:(CAA)3	100- 210	XM_013593707.3	[7]
AFCTT1-R	TTGTGGATTGGAACGAGT	18	51				
AGAT-012-F	GATAGTCCGTACCTTGGCTCTG	22	56.7	(GAT)3:(GAT)3:(GAT)5	106	DQ073091.1	[13]
AGAT-012-R	TGTTTCAGCTCTTCATCTACATCTTC	25	55				
AW01-F	ACCTGTTCTAAGGGAGATTTCG	22	54.2	(ATG)10	182	XM_024785635.2	HU
AW01-R	CAGGGGAAGCATACAAAACC	20	53.7				
AW09-F	TGGGTGGAGGAAATTACGAC	20	54.2	(CAA)11	157	XM_003613044.4	[31]
AW09-R	CCACATATGTTGCTGTTTCCA	21	53.6				

[30]	XM_003601 576.4	249	(TTC)5:(AAC)7:(CAA)4	56	22	ACCCTTGTGGGTCTCTCTCTT	AW213-F
				54	22	CATGTACGGGGATTGTTGTTTT	AW213-R
HU	AC123596.1 3	151	(CA)9	52	20	GCTTGTTCTTCTTCAAGCTC	B14B03-F
				51	20	ACCTGACTTGTGTTTTATGC	B14B03-R
[31]	OY283145.1	200-250	(AG)3:(GT)3:(TA)3 :(AC)3:(TT)4	55.3	19	CACGAGGCACACTTCCATT	BEE-F
				55.7	20	GTTGTTTGTGTCCCCAGGAG	BEE-R
HU	OX326970.1	160	(GA)12:(TA)3:(TA) 5	52	22	TTCAATCTTCTCCTTTGATTGC	BF106-F
				52	22	GTTTTCTCTGGATATTGGATGG	BF106-R
[7]	XM_003596 968.4	156	(GA)12:(TA)3:(TA) 5	52	22	TCAGTGAGAAGGTCGTTTCATGT	BF111-F
				56	22	TGAGAGAGAGTTCGTGGGTTG	BF111-R
[7]	XM_013604 726.3	204	(CTT)9:(TC)3:(CT) 3	56	21	GAAGACACAATGAGTAGCAGAG C	BF644149-F
				56	23	TGGCCCATGTTTCTCAGACT	BF644149-R
[31]	XM_013601 871.3	248	(AAG)6:(TCT)3:(T C)3	56	20	AGTCAACTCACAAACCCACTT	BI90-F
				57	22	TGGAGAGATGGTAGAGGGAGAG	BI90-R
HU	X99467.1	233	(ATA)6:(AA)8:(TT) 3	53.8	23	CGAACTTCGAATTACCAAAGTCT	ENOD20-F
				53.2	21	TTGAGTAGCTTTTGGGTTGTC	ENOD20-R
[32]	XM_039833 006.1	125	(TCT)8:(TCA)5	50	20	GGGTTTTTGATCCAGATCTT	MA660456-F
				56	20	AAGGTGGTCATACGAGCTCC	MA660456-R
[33]	XR_0056435 02.1	75	(TCG)3:(CGA)3	53.7	18	CAAAGAGGTCGTCGGGAT	MS-30-F
				55.6	24	GTTCGTGTGCAGTGATTATCACT A	MS-30-R
[33]	XM_024781 413.2	183	(CAA)3	51.4	23	AGATTATCCCATTTTTCCCTG	MS-40-F
				53.6	24	CGAATGAGAGTATTAAGGAAGT CG	MS-40-R
[33]	XM_003594 042.4	186	(CA)3:(CCA)5	58.6	23	AACCACACACTCTAGTCCCACC	MS-43-F
				52.1	24	TGAAGCTTTGATTCTTAGAATTG G	MS-43-R
HU	XM_024772 693.2	131	(AAG)8:(GA)8(CT) 9:(CTT)5(AAG) 5:(GA)8	55	20	GGCGGTGAAGAAGTAAACGA	MTIC188-F
	BT140900.1	122	(GAA)3:(CT)18:(T CT)7	56	20	AATCGGAGAAACACGAGCAC	MTIC188-R
HU	OY283139.1	138	(GA)3:(TC)4:(TC) 5:(CT)5	52	23	TCTAGAAAAAGCAATGATGTGA G	MTIC19-F
				54	22	ATGCAACAGAAGAAGCAAAACA	MTIC19-R
HU	XM_003614 974.4	123	(TTA)8:(TTC)3	50	22	TTCTTCTTCTAGGAATTTGGAG	MTIC238-F

				51	20	CCTTAGCCAAGCAAGTAAAA	MTIC238-R
[33]	-	-	(TTC)3:(TTA)8:(TT) ₃	56.8	27	GTTTCTTCCTTAGCCAAGCAAGTAAAA	MTIC238-PT-R
[33]	OY283139.1	128	(TC)4:(ATT)4:(GA)8:(TC)3	47	20	GGACAAAATTGGAAGAAAAA	MT45-F
				50	20	AATTACGTTTGTGGATGC	MT45-R
HU	XM_013587350.3	133	(TC)6:(TC)3	55	23	TCACAACATGCAACAAAAGTG	MTIC153-F
				54	20	TGGGTCGGTGAATTTTCTGT	MTIC153-R
HU	XM_013607729.3	123	(TC)6:(TCT)3:(CC) ₃	54	20	ATCGGCGTCTCAGATTGATT	MTIC365-F
				51	20	CGCCATATCCAAATCCAAAT	MTIC365-R
HU	OY283139.1	128	(TC)4:(GA)8:(ATT)3:(TC)3	47	20	GGACAAAATTGGAAGAAAAA	MTIC451-F
				50	20	AATTACGTTTGTGGATGC	MTIC451-R
HU	XM_003603622.4	113	(TTC)6:(GA)3	51	20	GGATTGAAATGCACTCTCTC	MTIC475-F
				51	18	TTAATAAACGCCGCTCCT	MTIC475-R
HU	XM_003600345.4	119	(AGA)7:(GTC)3	51.6	23	AAGCTGTATTTCTGATACCAAAC	MTIC131-F
				55.1	20	CGGGTATTCCTCTTCCTCCA	MTIC131-R
HU	XM_013595577.3	170	(TT)4:(AG)9:(AAG) ₃	56.1	19	GCAGTTCGCTGAGGACTTG	MTIC134-F
				53.9	25	CAATTAGAGTCTACAGCAAAA ACT	MTIC134-R
HU	XM_024771500.1	143	(CT)8	51.2	20	AAATGGAAGAAAGTGTCACG	MTIC183-F
				52	20	TTCTCTTCAAGTGGGAGGTA	MTIC183-R
HU	XM_039831349.1	115	(TC)9	51.7	22	CAAACCCTTTCAATTTCAACC	MTIC189-F
				54.8	20	ATGTTGGTGGATCCTTCTGC	MTIC189-R
HU	XM_013606923.3	90-364	(AAG)5 1st locus// (GTT)3 2nd locus	55.9	20	GGTGATTGACTGTGGTGTCTG	MTIC21-F
	AC140549.12			56.2	20	ATCCGGTCTCCCAGGTTCTA	MTIC21-R
HU	XM_039829816.1	130	(ATT)7:(AA)3	51.8	20	GCGTAACGTAACAACATTCA	MTIC233-F
				50.1	20	AAGGAACAATCCCAGTTTTT	MTIC233-R
HU	XM_003614974.4	123	(GAT)3:(CTT)4:(TTA)8:(TT)3:(ATT)3	49.9	22	TTCTTCTTCTAGGAATTTGGAG	MTIC238-F
				50.8	20	CCTTAGCCAAGCAAGTAAAA	MTIC238-R
HU	XM_013607701.3	115	(TC)15:(TT)3	51.7	20	CTAGTGCCAACACAAAAACA	MTIC452-F
				50	20	TCACAAAACTGCATAAAGC	MTIC452-R
[7]	X60387.1	190	(TA)20	49.6	22	CGGAAAGATTCTTGAATAGATG	MTLEC2A-F

				52.4	18	TGGTTCGCTGTTCTCATG	MTLEC2A-R
	AF274880.1	167	(TTG)5:(AG)12:(AGA)3:(CACT)3	51	19	GAAGTGGAAATGGGAAACC	MTR58-F
				55.2	22	GAGTGAGTGAGTGTAAGAGTGC	MTR58-R
[34]	XM_024783011.2	196	(CTA)3:(TAC)5	54.8	22	TTGAGGGTTCAACGTTTGGT	MTTFSSR-19-F
				55	21	CTCGAAGCGCGTTAAGAAAC	MTTFSSR-19-R
[34]	XM_039829869.1	210	(TCA)5:(CAA)3	56.5	22	TCCCTACAGCAGGAGGTGAT	MTTFSSR-41-F
				55	21	GATGCTCAGAACAGCATGA	MTTFSSR-41-R
[34]	XM_013609743.3	238	(AAT)5	56.5	22	TTCAAGACCGTCTCGGCTAC	MTTFSSR-70-F
				52.9	21	TGATGATTGTTCTGCTGCAA	MTTFSSR-70-R
[31]	XM_003607321.4	209	(AA)3:(TCT)3:(GAGAG)4:(GAA)13:(GA)3	51.4	20	CCAACATCCTTTTCCTTCC	TC7-F
				55.1	21	TTCTCTCCATACCTCGCTCAA	TC7-R

نمونه‌های DNA استخراج شده به روش اسپکتروفوتومتری و با استفاده از دستگاه نانو دراپ ND-1000 برای تعیین غلظت نمونه های DNA و بررسی نسبت جذب A230/260 و A260/280 انجام شد. برای تعیین کیفی DNA استخراج شده نیز از ژل آگارز ۰/۷ درصد و بافر TAE1x استفاده شد.

۲-۲-۳ بهینه‌سازی واکنش های PCR

برای بهینه‌سازی تکثیر قطعات، شرایط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای هر جفت آغازگر با تعیین دمای بهینه اتصال، غلظت بهینه یون منیزیم، تعداد سیکل و تعیین زمان بهینه مراحل مختلف تکثیر با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Applied Biosystems Veriti 96-Well انجام شد (جدول ۱-فایل اطلاعات تکمیلی).

۲-۲-۴ تفکیک و شناسایی آلل‌های حاصل از تکثیر

جایگاه‌ها با استفاده از الکتروفورز عمودی

برای تفکیک قطعات حاصل از تکثیر از سیستم ژل الکتروفورز Ethan DALT Twelve (GE Healthcare) و ژل آکرلامید ۱۰ درصد استفاده شد. رنگ‌آمیزی ژل‌ها با روش نیترات نقره و اسکن تصاویر ژل‌ها با استفاده از نرم

۲-۲-۲ استخراج DNA

برای استخراج DNA از بذر یونجه که به دلیل وجود مواد پلی‌فنولی و پلی‌ساکاریدی چالش‌برانگیز است، روش بهینه‌ای با تغییراتی در روش Doyle and Doyle معرفی شد. در این روش از PVP با غلظت ۲ درصد، Guanidine Thiocyanate ۰/۸ مولار، Ammonium Thiocyanate ۰/۴ مولار و Sodium Acetate ۰/۱ مولار استفاده شد. ابتدا ۱۰۰ عدد بذر یونجه پودر شده و ۱۰۰ میلی‌گرم از آن به ویال منتقل شد. سپس بافر استخراج از پیش گرم شده به ویال اضافه و نمونه‌ها به مدت یک ساعت در حمام آب‌گرم قرار گرفتند. پس از سانتریفوژ کردن برای رسوب بقایای سلولی، فاز مایع به ویال جدید منتقل و مخلوط کلروفورم و ایزوآمیل الکل به آن اضافه شد. پس از چند بار اینورت کردن و سانتریفوژ مجدد، RNase A به نمونه‌ها افزوده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس مخلوط ترایزول به نمونه‌ها اضافه و دوباره سانتریفوژ شد. فاز مایع مجدداً منتقل و ایزوپروپانول سرد و سدیم استات به آن اضافه می‌شود. در نهایت، رسوب DNA با اتانول ۷۰ درصد شسته شده و در آب مقطر حل شد. آنالیز کمی

افزار LabScan و اسکنر DIGE Imager, GE Ethan Healthcare انجام شد.

۲-۳ آنالیز داده‌ها

۲-۳-۱ تعیین اندازه آلل‌های نشانگرهای ریزماهواره

مورد بررسی

در تحلیل داده‌ها، مرا حل زیر به منظور تعیین اندازه آلل‌های نشانگرهای ریزماهواره مورد بررسی اجرا شد. ابتدا، با استفاده از نرم‌افزار UVDoc، اندازه آلل‌ها برای هر نشانگر و در مورد هر نمونه به دقت تعیین شد. پیش از شروع به تعیین اندازه آللی برای هر نشانگر ریزماهواره، پروفایل‌های تعداد مناسبی از نمونه‌ها، حداقل ۲۰ نمونه، بررسی شد. این بررسی به ایجاد درک کلی از الگوهای عمومی پروفایل نشانگرها کمک کرده و همچنین باندهای غیراختصاصی ناشی از عوامل خارجی که ممکن است باعث امتیازدهی نادرست شوند، شناسایی و حذف شد. در ادامه، برای هر جایگاه ریزماهواره بر اساس بررسی اولیه از اندازه قطعات و اطلاعات موجود در مورد ساختار توالی‌های تکرارشونده، طی فرایند Allele Binning، مجموعه آللی به عنوان اعداد صحیح تعریف شده و اندازه آن‌ها مشخص شد. همچنین، باندهای غیراختصاصی، از جمله الگوهای استاتر، شناسایی و حذف شدند.

۲-۳-۲ آنالیز داده‌ها بر اساس اندازه آللی

برای همه جایگاه‌های چندشکل که الکتروفروگرام‌های واضحی نشان دادند، تعداد کلی آلل‌ها، فراوانی آلل‌ها، یکنواختی و هتروزیگوسیتی مورد انتظار برآورد شد. با توجه به ماهیت پلی‌پلوئیدی ژنوم یونجه و عدم کارایی نرم‌افزارهای رایج مورد استفاده برای آنالیز داده‌های نشانگرهای ریزماهواره، از پکیج PolySat در محیط R که ابزار مناسبی را برای کار با این گونه داده‌ها و با هر سطح

پلوئیدی فراهم می‌نماید استفاده شد [35]. برای تعیین فواصل ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها و تهیه ماتریس مربوطه، با توجه به اتوتتراپلوئید بودن گیاه یونجه براساس توصیه راهنمای نرم‌افزار PolySat از توابع Bruvo distance (فاصله ژنتیکی Bruvo [36]) و "meandistance.matrix2" برای مجموعه داده‌های هگزاپلوئید یا پایین‌تر که در آن‌ها تغییرات پلوئیدی به دلیل دو برابر شدن ژنوم یا از دست دادن ژنوم می‌باشد، استفاده شد. از ماتریس حاصل از تابع Bruvo برای آنالیز PCA^۱ (تجزیه و تحلیل مولفه‌های اصلی)، ارزیابی روابط ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها، آنالیز کلاستر و گروه‌بندی‌ها استفاده شد. تمامی آنالیزها با استفاده از RStudio (نسخه ۲۰۲۳، ۶، ۱، ۵۲۴ و R نسخه ۴، ۳، ۱) انجام داده شد.

۳- نتایج

۳-۱ بهینه‌سازی تکثیر آغازگرهای ریزماهواره

مقادیر بهینه پارامترهای مربوط به تکثیر آمپلیکون‌های (قطعات تکثیری) مورد نظر با استفاده از آغازگرهای ریزماهواره، از جمله گرادیان دمایی برای دمای اتصال و همچنین غلظت $MgCl_2$ برای هر آغازگر به‌طور جداگانه تعیین شد (جدول ۲-فایل اطلاعات تکمیلی).

۳-۲ بررسی پروفایل و الگوی بانندی جایگاه‌های

ریزماهواره مورد بررسی بر روی DNA ۱۰۰ بذر

در بین آغازگرهای مورد استفاده، ۹ آغازگر قابلیت تفکیک توده‌های یونجه را دارا بودند. الگوی تفکیک ۱۰ توده یونجه براساس ۹ آغازگر در شکل ۲ ارائه شد. آلل‌های اختصاصی هر جایگاه برای هر توده در جدول ۲ و ماتریس تشابه توده‌های یونجه مورد بررسی که براساس ضریب تشابه Dice (Nei) محاسبه شده در جدول ۳ آورده شده است.

^۱ Principal Coordinate Analysis (PCA)

جدول ۲ آلل‌های مربوطه به نشانگرهای غربال شده در توده‌های مختلف یونجه مورد بررسی.

نشانگر										توده
29-N	27-G	26-Y	25-B	FM	FMC	21-R	9-H	5-B	2-G	
۲۱۸	۲۱۸	۲۱۸	۲۱۸	۲۱۸	۲۱۸	۲۱۸	۲۱۸	۲۱۸	۲۱۸	ACT009
۲۱۰	۲۱۰	۲۱۰	۲۱۰	۲۱۰	۲۱۰	۲۱۰	۲۱۰	۱۹۸	۲۰۴	
۲۰۴	۲۰۴	۲۰۴	۲۰۴	۲۰۴	۲۰۴	۲۰۴	۲۰۴		۱۹۸	
۱۹۸	۱۹۸	۱۹۸	۱۹۸	۱۹۸	۱۹۸	۱۹۸	۱۹۸		۱۸۸	
		۱۸۸	۱۸۸	۱۸۸	۱۸۸					
۱۷۹	۱۷۹	۱۷۹	۱۷۹	۱۷۹	۱۷۹	۱۷۹	۱۷۹	۱۷۹	۱۷۹	AFCA11
۱۵۷	۱۵۷	۱۵۷	۱۵۷	۱۵۷	۱۵۷	۱۵۷	۱۵۷	۱۵۷	۱۵۷	
۱۴۷	۱۴۷	۱۴۷	۱۴۷	۱۴۷	۱۴۷	۱۴۷	۱۴۷	۱۴۷	۱۴۷	
۱۳۷	۱۳۷		۱۳۷			۱۳۷	۱۳۷	۱۳۷	۱۳۷	
۲۰۸	۲۱۷	۲۰۵	۲۰۲	۲۰۸	۲۰۸	۲۰۸	۲۰۲	۲۰۸	۲۰۸	BI90
۲۰۵	۲۰۸	۱۸۸	۱۸۸	۲۰۵	۲۰۵	۲۰۵	۱۸۸	۲۰۲	۲۰۲	
۱۸۸	۲۰۵			۱۹۴	۱۹۴	۱۸۸		۱۹۴	۱۹۴	
	۱۸۸			۱۸۸	۱۸۸			۱۸۸	۱۸۸	
۳۴۵	۳۵۱	۳۴۵	۳۵۱	۳۵۱	۳۵۱	۳۵۱	۳۵۱	۳۵۱	۳۵۱	MS30
۲۹۷	۳۴۵	۲۹۷	۳۴۵	۳۴۵	۳۴۵	۳۴۵	۳۴۵	۳۴۵	۳۴۵	
۲۴۳	۲۹۷	۲۴۳	۲۹۷	۲۹۷	۲۹۷	۲۹۷	۲۹۷	۲۹۷	۲۹۷	
۲۳۱	۲۴۳	۲۳۱	۲۴۳	۲۴۳	۲۴۳	۲۴۳	۲۴۳	۲۴۳	۲۴۳	
	۲۳۱		۲۳۱	۲۳۱	۲۳۱	۲۳۱	۲۳۱	۲۳۱	۲۳۱	
۱۸۲	۱۸۲	۱۸۲	۱۸۲	۱۸۲	۱۸۲	۱۸۲	۱۸۲	۱۸۲	۱۸۲	MTIC134
۱۷۵	۱۷۵	۱۷۵	۱۷۵	۱۷۵	۱۷۵	۱۷۵	۱۷۵	۱۷۵	۱۷۵	
۱۷۰	۱۷۰	۱۷۰	۱۶۳	۱۷۰	۱۷۰	۱۷۰	۱۷۰	۱۷۰	۱۷۰	
۱۶۳	۱۶۳	۱۶۳		۱۶۳	۱۶۳	۱۶۳	۱۶۳	۱۶۳	۱۶۳	
۱۵۳	۱۵۳	۱۵۳	۱۵۳	۱۵۷	۱۵۷	۱۵۳	۱۵۳	۱۵۳	۱۵۳	MTIC183
۱۴۹	۱۴۹	۱۴۹	۱۴۹	۱۵۳	۱۵۳	۱۴۹	۱۴۹	۱۴۹	۱۴۹	
۱۳۳	۱۴۵	۱۴۵	۱۴۵	۱۴۹	۱۴۹	۱۴۵	۱۴۵	۱۴۵	۱۴۵	
	۱۴۱	۱۳۳	۱۴۱	۱۴۱	۱۴۱	۱۴۱	۱۴۱	۱۳۳	۱۴۱	
	۱۳۳		۱۳۳	۱۳۳	۱۳۳	۱۳۳	۱۳۳		۱۳۳	
				۱۲۹	۱۲۹					
۱۵۱	۱۵۴	۱۵۱	۱۵۱	۱۵۱	۱۵۱	۱۵۱	۱۵۴	۱۵۱	۱۵۱	MTIC233
۱۴۲	۱۵۱	۱۴۲	۱۴۲	۱۴۴	۱۴۴	۱۴۲	۱۵۱	۱۴۲	۱۴۲	
۱۳۵	۱۴۲	۱۳۸	۱۳۵	۱۳۸	۱۳۸	۱۳۵	۱۴۲	۱۳۵	۱۳۵	
۱۲۳	۱۳۵	۱۲۹	۱۲۹	۱۲۹	۱۲۹	۱۲۹	۱۳۵	۱۲۹	۱۲۹	
	۱۲۹	۱۲۳	۱۲۳	۱۲۳	۱۲۳		۱۲۹			
	۱۲۳									
۲۳۶	۲۳۶	۲۳۶	۲۳۶	۲۳۶	۲۳۶	۲۳۶	۲۳۶	۲۴۱	۲۴۱	TC7
۲۳۱	۲۳۱	۲۳۱	۲۳۱	۲۳۱	۲۳۱	۲۳۱	۲۳۱	۲۳۶	۲۳۶	

۲۲۶	۲۲۶	۲۲۶	۲۲۶	۲۲۶	۲۲۶	۲۲۶	۲۲۶	۲۳۱	۲۳۱
	۲۲۲		۲۲۲	۲۲۲	۲۲۲	۲۲۲	۲۲۲	۲۲۶	۲۲۶
۲۲۲									

جدول ۳ ماتریس تشابه توده‌های یونجه مورد بررسی براساس ضریب تشابه Dice و برای نمونه‌های ۱۰۰ بذری.

29-N	27-G	26-Y	25-B	Fm	Fmc	21-R	9-H	5-B	2-G	
۰,۸۷۳	۰,۹۲۳	۰,۸۴۵	۰,۸۹۲	۰,۸۳۱	۰,۸۳۱	۰,۹۳۳	۰,۹۰۷	۰,۹۱۹	۱,۰۰۰	2-G
۰,۸۷۰	۰,۹۲۱	۰,۸۱۲	۰,۸۶۱	۰,۸۰۰	۰,۸۰۰	۰,۹۳۲	۰,۹۰۴	۱,۰۰۰	۰,۹۱۹	5-B
۰,۸۸۶	۰,۹۶۱	۰,۸۵۷	۰,۹۳۲	۰,۸۱۶	۰,۸۱۶	۰,۹۷۳	۱,۰۰۰	۰,۹۰۴	۰,۹۰۷	9-H
۰,۹۱۴	۰,۹۶۱	۰,۸۵۷	۰,۹۳۲	۰,۸۴۲	۰,۸۴۲	۱,۰۰۰	۰,۹۷۳	۰,۹۳۲	۰,۹۳۳	21-R
۰,۸۰۶	۰,۸۶۱	۰,۸۶۱	۰,۸۵۳	۱,۰۰۰	۱,۰۰۰	۰,۸۴۲	۰,۸۱۶	۰,۸۰۰	۰,۸۳۱	Fmc
۰,۸۰۶	۰,۸۶۱	۰,۸۶۱	۰,۸۵۳	۱,۰۰۰	۱,۰۰۰	۰,۸۴۲	۰,۸۱۶	۰,۸۰۰	۰,۸۳۱	Fm
۰,۸۷۰	۰,۹۲۱	۰,۸۹۹	۱,۰۰۰	۰,۸۵۳	۰,۸۵۳	۰,۹۳۲	۰,۹۳۲	۰,۸۶۱	۰,۸۹۲	25-B
۰,۸۷۹	۰,۸۴۹	۱,۰۰۰	۰,۸۹۹	۰,۸۶۱	۰,۸۶۱	۰,۸۵۷	۰,۸۵۷	۰,۸۱۲	۰,۸۴۵	26-Y
۰,۹۰۴	۱,۰۰۰	۰,۸۴۹	۰,۹۲۱	۰,۸۶۱	۰,۸۶۱	۰,۹۶۱	۰,۹۶۱	۰,۹۲۱	۰,۹۲۳	27-G
۱,۰۰۰	۰,۹۰۴	۰,۸۷۹	۰,۸۷۰	۰,۸۰۶	۰,۸۰۶	۰,۹۱۴	۰,۸۸۶	۰,۸۷۰	۰,۸۷۳	29-N

امکان تجزیه و تحلیل ترکیبی دیپلوئیدها و پلی پلوئیدها را فراهم می‌کند [۳۶].

با توجه به الگوهای بانندی متمایز ایجاد شده توسط نشانگرهای مختلف بر روی نمونه ۱۰۰ بذری DNA توده‌های یونجه، نتایج زیر قابل استنباط می‌باشند: دو توده 2-G و 5-B دارای الگوی بانندی متمایزی بوده و به تنهایی با استفاده از نشانگر ACT009 از سایر توده‌ها قابل تفکیک می‌باشند (شکل ۱-الف). همچنین، توده‌های خارجی و 26-Y با الگوی بانندی متمایزی حاصل از نشانگر AFCA11 به تنهایی با استفاده از این نشانگر قابل تفکیک از سایر توده‌ها می‌باشند (شکل ۱-ب).

توده‌های 21-R و 29-N و همچنین 9-H، 25-B و 26-Y به‌طور جداگانه از طریق نشانگر BI90 قابل تفکیک می‌باشند (شکل ۱-ج). علاوه بر این، توده‌های 26-Y و 29-N با استفاده از نشانگر MS30 از سایر توده‌ها قابل

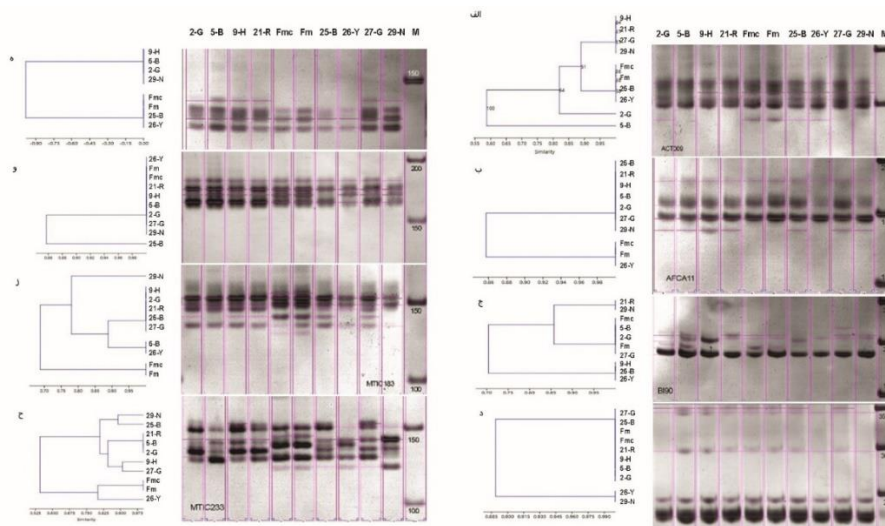
بسته نرم‌افزاری PolySat برای تجزیه و تحلیل داده‌های ریزماهواره اتو/آلو تتراپلوئید ارائه شده است. این نرم‌افزار می‌تواند داده‌های ژنوتیپی در هر سطح پلوئیدی را از جمله در جمعیت‌های دارای سطوح پلوئیدی مختلف مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار دهد. همچنین، این نرم‌افزار می‌تواند فاصله‌های دو به دوی بین افراد را با استفاده از مدل موتاسیون گام به گام و آلل‌های بی‌نهایت^۲ محاسبه و همچنین پلوئیدی را براساس تعداد و فراوانی آلل‌ها و مقادیر FST را نیز برآورد کند. در مطالعه حاضر از تابع meandistance.matrix2 و فاصله ژنتیکی Bruvo^۱ استفاده شد. بکارگیری تابع meandistance.matrix2 به دلیل مدل‌سازی تعداد نسخه آلل‌ها نتایج دقیق‌تری را به همراه دارد [۳۵]. همچنین، فاصله ژنتیکی Bruvo فرایندهای جهشی گام به گام^۳ را برای ریزماهواره‌ها در نظر گرفته و

^۲ stepwise mutational processes

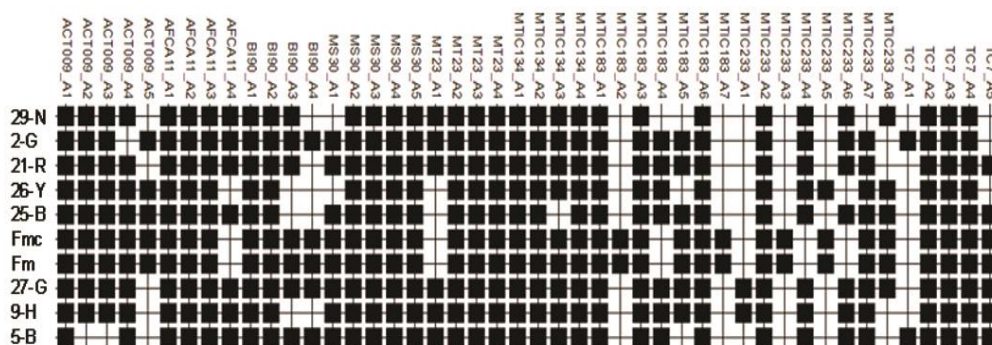
^۳ Stepwise mutation and infinite alleles model

29-N" و 26-Y و 29-N و "و 2-G و 5-B" به صورت جفتی با استفاده از نشانگر MTIC7 از سایر توده‌ها تفکیک می‌شوند (شکل ۱-ط). برخی از جایگاه‌ها از جمله MTLEC2A علیرغم چندشکلی نسبتاً زیاد، تکرارپذیری قابل قبولی برای تمامی توده‌ها از خود نشان ندادند و بدین ترتیب از بررسی بیشتر و مطالعات بعدی حذف شدند. بنابراین، براساس نتایج حاصل، الگوی بارکدینگ (پروفایل بانندی) نشانگرهای مورد استفاده برای توده‌های یونجه مورد بررسی به طور شماتیک به صورت شکل ۲ ترسیم شد. این الگوی بانندی برای شناسایی توده‌های یونجه مورد بررسی قابل استفاده خواهد بود.

تفکیک می‌باشند (شکل ۱-د). توده 25-B به طور مشخص با استفاده از نشانگر MTIC134 از سایر توده‌ها قابل تفکیک است (شکل ۱-ه). توده‌های "خارجی FMC و FM" و همچنین توده 29-N با استفاده از نشانگر MTIC183 به طور مجزا از بقیه توده‌ها قرار می‌گیرند. همچنین، توده‌های 5-B و 26-Y در این جایگاه از الگوی مشابهی برخوردارند (شکل ۱-ز). توده‌های 26-Y، "خارجی FMC و FM"، 9-H و 27-G، 25-B و 29-N و 21-R و 5-B و 2-G با استفاده از نشانگر MTIC233 با الگوهای مشابهی از هم قابل تفکیک می‌باشند (شکل ۱-ح). در نهایت، توده‌های "26-Y و 29-N و 26-Y و



شکل ۱ پروفایل آلی جایگاه‌های ریزماهواره غربال شده به همراه دندروگرام تفکیک توده‌های یونجه مورد بررسی.



شکل ۲ ماتریس باینری (حضور/عدم حضور) آل‌های جایگاه‌های مورد استفاده برای ژنوتایپینگ توده‌های یونجه مورد بررسی.

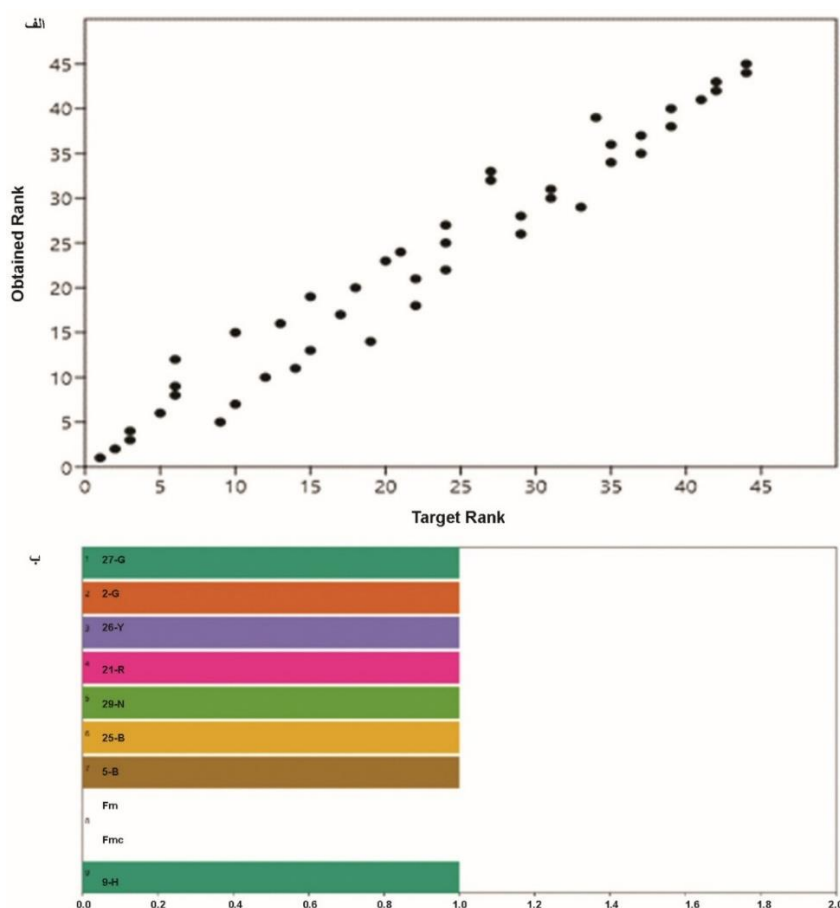
۳-۳ بررسی کیفی نتایج

برای اطمینان از نتایج حاصل، از روش شپارد استفاده شد. در نمودار شپارد مقادیر به دست آمده در مقابل مشاهده شده (هدف) نشان‌دهنده کیفیت نتایج می‌باشد. در حالت ایده‌آل، همه نقاط باید روی یک خط مستقیم صعودی قرار گیرند. بنابراین، نشانگرهای مورد استفاده به خوبی برای ژنوتایپینگ توده‌های یونجه قابل استناد می‌باشند (شکل ۳-الف). همچنین، نمودار Silhouette [۳۷] (شکل ۳-ب) نشان می‌دهد که آیا تفکیک هر توده از سایر توده‌های به خوبی انجام گرفته است یا خیر. مقادیر نمودار در مقیاسی

از ۱- تا ۱ می‌باشد که در آن ۱ به معنای انتساب کاملاً مناسب برای یک خوشه است. رقم ۱- به این معنی است که توده بهتر است در یک خوشه دیگر قرار می‌گرفت. رقم صفر (۰) به این معنی است که توده مورد نظر در مرز بین دو خوشه قرار دارد.

۴-۳ تجزیه خوشه‌ای

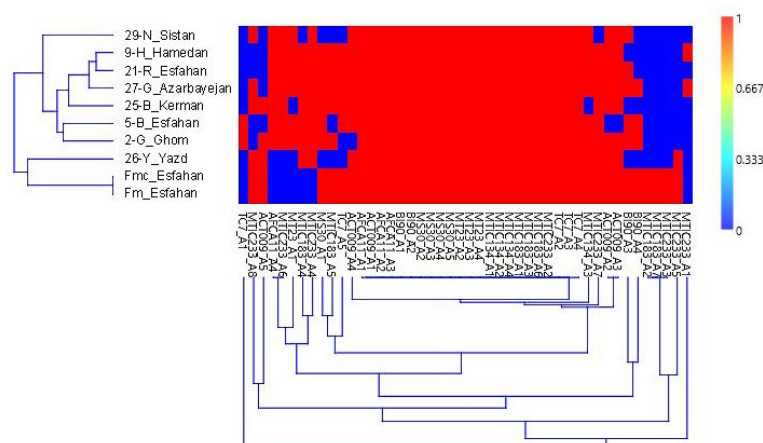
همان‌گونه که در شکل ۴ و ۵ مشاهده می‌شود، با استفاده از نشانگرهای غربال شده تمامی توده‌ها به جز دو نمونه خارجی (Fm و Fmc) از یکدیگر تفکیک شده‌اند.



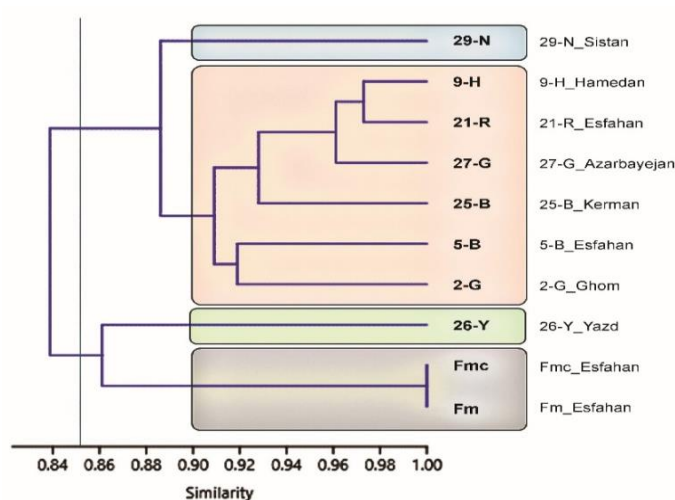
شکل ۳ بررسی کیفیت نتایج براساس Shepard plot (الف). بررسی کیفیت آنالیز کلاسترینگ و تفکیک توده‌ها براساس Silhouette plot (ب).

B، 5-B و 2-G؛ گروه دوم شامل دو زیر گروه (الف) 26- Y و (ب) توده‌های خارجی (Fm و Fmc). بر این اساس دورترین توده‌ها با توجه به فاصله ژنتیکی مربوط به توده‌های 5-B و خارجی و همچنین بین توده‌های 29-N و خارجی و از سوی دیگر نزدیکترین فاصله مربوط به 27-G، 9-H و 21-R به دست آمد. با توجه به نتایج حاصل به نظر می‌رسد توده‌های 9-H، 21-R، 27-G، 25- B، 5-B و 2-G دارای زمینه ژنتیکی مشترک و با شباهت بیشتری نسبت به سایر توده‌ها می‌باشند.

در این رابطه بیشترین قابلیت تفکیک متعلق به نشانگرهای زیر بود: MTIC233 (آلل‌های A1، A3، A4، A5 و A6)، BI90 (آلل‌های A3 و A4)، ACT009 (آلل A5)، TC7 (آلل‌های A1 و A5)، MTIC183 (آلل‌های A2، A4، A5 و A7) و MS30 (A1)، MTIC238 (A1) و AFCA11 (آلل A4).
بر اساس نتایج کلاسترینگ، توده‌های مورد بررسی به دو گروه اصلی تقسیم شدند (شکل ۵). گروه اول شامل دو زیر گروه (الف) 29-N و (ب) 9-H، 21-R، 27-G، 25-



شکل ۴ Two-way clustering با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره و الگوریتم UPGMA بر روی توده‌های یونجه مورد بررسی.



شکل ۵ دندروگرام مبتنی بر الگوریتم UPGMA برای نمونه‌های ۱۰۰ بذری توده‌های یونجه با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره مورد

بررسی

۳-۵ تجزیه به مؤلفه‌های اصلی

تجزیه به مؤلفه‌های اصلی یک تکنیک آماری چند متغیره است که برای ترسیم ساختار ژنتیکی یا روابط بین جمعیت‌ها یا افراد استفاده می‌شود. جدول ۴ مقادیر ویژه^۴ و درصد واریانس توجیه شده توسط هر مؤلفه را نشان می‌دهد. مقدار ویژه، میزان تغییرات ژنتیکی توجیه شده توسط هر مؤلفه را نشان می‌دهد. مقادیر ویژه بالاتر نشان می‌دهد که مؤلفه مربوطه بخش بزرگ‌تری از تنوع ژنتیکی داده‌ها را ثبت می‌کند. درصد واریانس توجیه شده توسط هر مؤلفه با تقسیم مقدار ویژه آن مؤلفه بر مجموع همه مقادیر ویژه و سپس ضرب در ۱۰۰ محاسبه می‌شود.

در این بررسی، مؤلفه‌های اول و دوم جمعاً بیش از ۷۵ درصد واریانس را در بین توده‌های مورد نظر توجیه می‌کنند که این نشان‌دهنده توزیع مناسب نشانگرهای مورد استفاده در سطح ژنوم بوده و همچنین نشان می‌دهد که این نشانگرها اطلاعات مهمی در خصوص تنوع ژنتیکی توده‌های مورد بررسی را ارائه می‌دهند. آخرین مؤلفه دارای مقدار ویژه منفی (۰/۰۲۹۹۸۹-) است و ۳/۵۹۳۵-

درصد واریانس را توجیه می‌کند. یک مقدار ویژه منفی

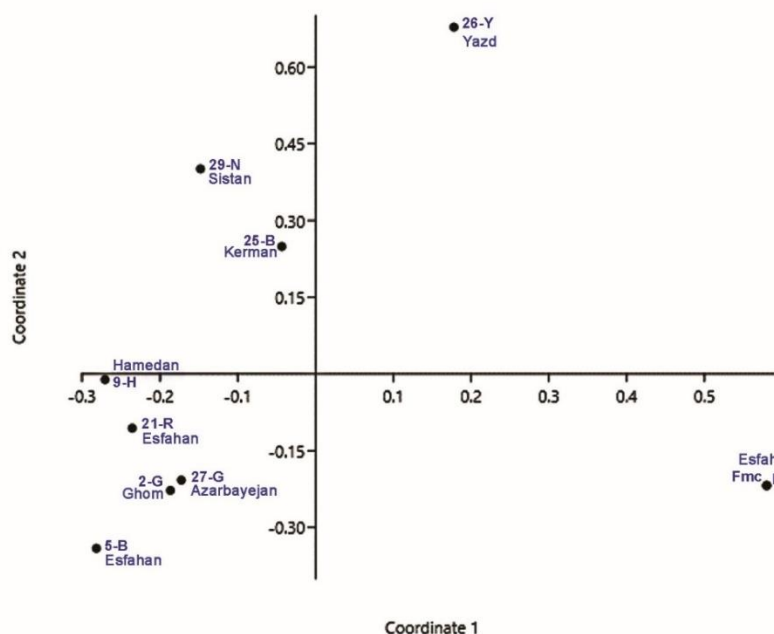
نشان‌دهنده‌ی نویز یا عدم ساختار در داده‌ها است. هر مؤلفه در آنالیز اصلی ترکیبی از جایگاه‌های ژنومی یا متغیرهای اولیه (در اینجا نشانگرهای ریز ماهواره یا SSRها) است که با هدف توضیح تنوع ژنتیکی در داده‌های ژنتیکی مورد مطالعه استفاده می‌شود. در مورد تجزیه و تحلیل مؤلفه‌های اصلی، هر مؤلفه یک ترکیب خطی از نشانگرها (در اینجا SSRها) است. در این آنالیز، مؤلفه‌ها به ترتیب اهمیت تفاوت‌های ژنتیکی را نشان می‌دهند. به عبارت دقیق‌تر، مؤلفه اول نشان می‌دهد که چه ترکیبی از نشانگرها بیشترین تفاوت‌های ژنتیکی را توضیح می‌دهد. مثبت یا منفی بودن مقدار مؤلفه نیز نشان‌دهنده جهت تفاوت‌های ژنتیکی است. به طور کلی، مؤلفه‌ها به تفسیر اهمیت هر عامل (نشانگر یا SSR) در تفاوت‌های ژنتیکی کمک می‌کنند.

در شکل ۶ نمودار پراکندگی PCA نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی بیان شده توسط گروه‌بندی توده‌های یونجه مورد بررسی براساس تجزیه و تحلیل چندشکلی نشانگرهای SSR و با در نظر گرفتن دو مؤلفه اصلی اول می‌باشد.

جدول ۴ مقادیر ویژه و درصد توجیه واریانس توسط هر مؤلفه در تجزیه به مؤلفه‌های اصلی.

مؤلفه	مقدار ویژه	درصد توجیه واریانس	واریانس تجمعی
۱	۰,۰۴۵۳۰۴	۵۴,۲۸۶	۵۴,۲۸۶
۲	۰,۰۱۸۲۶	۲۱,۸۸	۷۶,۱۶۶
۳	۰,۰۰۸۸۵۳۶	۱۰,۶۰۹	۸۶,۷۷۵
۴	۰,۰۰۵۲۶۴۸	۶,۳۰۸۷	۹۳,۰۸۴
۵	۰,۰۰۲۰۷۹۷	۲,۴۹۲۱	۹۵,۵۷۶
۶	۰,۰۰۰۶۶۱۹۶	۰,۷۹۳۲	۹۶,۳۸۶
۷	۳,۱۰۷۸ E-05	۰,۰۳۷۲۴	۹۶,۴۰۵
۸	۹,۱۶۴۴ E-18	۱,۰۹۸۱ E-14	
۹	-۲,۱۹۴۴ E-18	-۲,۶۲۹۵ E-15	
۱۰	-۰,۰۰۲۹۹۸۹	-۳,۵۹۳۵	

^۴ eigenvalues



شکل ۶ نمودار تجزیه به مؤلفه‌های اصلی برای توده‌های یونجه مورد بررسی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره.

کشت در نزدیکی یکدیگر برگردد که از توده‌های خارجی نسبت به سایر توده‌ها متمایز کرده است. توده 25-B و 29-N در سمت چپ بالای نمودار واقع شده‌اند، اما به علت نزدیک بودن مکان آنها نسبت به توده 26-Y، نشان دهنده تفاوت‌های ژنتیکی کمتری با آنها است. این مورد را می‌توان به میزان نزدیکی جغرافیایی یا تاریخی آنها با یکدیگر متناسب دانست. این توده‌ها ممکن است از اجداد مشترک یا ارتباط ژنتیکی نزدیکی بهره‌مند باشند. توده‌های 9-H، 21-R، 27-G، 5-B و 2-G دارای شباهت‌های ژنتیکی بیشتری با یکدیگر می‌باشد. این شباهت‌ها می‌تواند به معنای نزدیکی تاریخی یا جغرافیایی باشد. این توده‌ها نیز ممکن است دارای یک ریشه ژنتیکی مشترک یا تاریخچه ژنتیکی مشابه باشند.

۴-بحث

ادغام ارقام بومی یونجه در جمعیت‌های زراعی، از طریق هیبریداسیون با گونه‌های دیپلوئید وحشی در ژرم‌پلاس

به‌طور خلاصه، نمودار PCA به تحلیل تفاوت‌ها و شباهت‌های ژنتیکی بین توده‌ها کمک می‌کند و می‌تواند اطلاعات مفیدی در مورد تاریخچه جمعیتی، رابطه‌های ژنتیکی و الگوهای تکاملی فراهم کند. ساختار نمودار PCA می‌تواند تا حدی توزیع جمعیت‌ها در فضای جدیدی که توسط مؤلفه‌های اصلی ایجاد می‌شود را نشان دهد. در این بررسی، براساس تجزیه و تحلیل مؤلفه‌های اصلی، نتایج زیر قابل استنباط می‌باشند. توده‌های خارجی تفاوت‌های ژنتیکی معنی‌داری با سایر توده‌ها دارند و به میزان زیادی متمایز هستند. چنانچه به‌طور پیش‌فرض مطرح بود، این می‌تواند به علت جداشدگی جغرافیایی یا تاریخی مشخصی باشد. توده 26-Y دارای تفاوت‌های ژنتیکی معنی‌دار آن با دیگر توده‌هاست. همچنین ممکن است نشان‌دهنده اختلاط بیشتر این توده با توده‌های خارجی و یا ارتباطات ژنتیکی نزدیک‌تر باشد. این نزدیکی ممکن است به عوامل تاریخی یا جغرافیایی خاصی و یا

تتراپلوئید، به تنوع ژنتیکی بالا در یونجه تتراپلوئید کمک کرده است. این تنوع گواهی بر تاریخچه نسبتاً کوتاه اصلاح نژاد یونجه است. شایان ذکر است که یونجه تتراپلوئید تنوع ژنتیکی کمی پایین تر از همتای دیپلوئید خود را نشان می‌دهد [۱۲]. امکان استفاده از ریزماهوره‌های یونجه زراعی (*M. sativa*) در طیف وسیعی از گونه‌های یک ساله و چند ساله جنس *Medicago* نیز بررسی شده است. نتایج به‌دست آمده حاکی از آن است که ریزماهوره‌های طراحی شده از کتابخانه ژنومی یونجه می‌توانند برای ارزیابی روابط ژنتیکی، خویشاوندی‌های تاکسونومی و تشخیص‌های ژنوتیپی گونه‌های مختلف *Medicago* استفاده شود [۷]. نشانگرهای ریزماهوره در مقایسه با صفات مورفولوژیکی برای پیش‌بینی هتروزیس در تلاقی بین *M. sativa* و *M. sativa* subsp. *sativa* و *subsp. falcata* به کار گرفته شدند [۳۸]. همچنین، با استفاده از چنین آغازگرهایی، تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیتی شش جمعیت یونجه‌های زراعی (*M. sativa* L.) ایران از مناطق یزد، اصفهان، کرمان، خراسان، لرستان و همدان توسط ۸ نشانگر ریزماهوره، نشان دادند که میزان تنوع درون جمعیت‌ها به مراتب بیشتر از تنوع بین جمعیت‌ها بوده، گیاهان درون جمعیت‌ها هتروزیگوسیتی بالایی داشته و جمعیت‌های مختلف ناهمگن بودند [۱۳]. فلاژوله و همکاران (۲۰۰۵)، با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره تنوع ژنتیکی بین هفت رقم یونجه زراعی را بررسی و تنوع بالایی را در آن‌ها گزارش کردند [۱۳]. الوود و همکاران (۲۰۰۶)، شش جایگاه ریزماهوره را برای بررسی تنوع ژنتیکی نمونه‌های *M. truncatula* مورد استفاده قرار دادند [۳۹]. ژولیر و همکاران (۲۰۰۳)، ۸۷ آغازگرهای ریزماهوره و AFLP را برای تعیین ساختار ژنتیکی و نقشه‌یابی در جمعیت‌های یونجه تتراپلوئید مورد استفاده قرار دادند [۳۲]. عرفانی مقدم (۱۳۸۲) نشان داد که از میان ۴۷ جفت آغازگر EST-SSR متعلق به *M.*

truncatula ۳۰ جفت آغازگر در یونجه حفاظت شده و می‌توان از آن‌ها برای مطالعات تنوع ژنتیکی بین توده‌های یونجه معمولی استفاده کرد [۴۰].

با اینکه، متولی واردات بذر به کشور وزارت جهاد کشاورزی است اما آمار دقیقی از میزان واردات آن در دسترس نمی‌باشد، از طرفی صادرات آن نیز از مبادی قانونی و رسمی از سال ۱۳۷۰ ممنوع شده است. با این اوصاف، با توجه به شرایط اقلیمی و آب و هوایی کشور و همچنین با افزایش نیاز به تولید دام و تأمین علوفه اقدامات اصلاحی مناسب و سریع در این محصول ضروری است. عدم وجود نظارت خاص در تولید بذور ارقام و توده‌های مختلف یونجه و همچنین نبود اطلاعات دقیق از عملکرد هر یک از این توده‌ها و میزان خلوص ژنتیکی آن‌ها، لزوم شناسایی و معرفی توده‌های برتر با عملکرد مطلوب و درصد خلوص بالا را کاملاً محسوس می‌کند.

در طی مدت طولانی، انتخاب طبیعی در محیط‌های مختلف منجر به ایجاد ژرمپلاسسم متنوعی از گیاه یونجه شده که در این مطالعه به وضوح قابل مشاهده است. در این فرایند تعداد زیادی ارقام محلی توسط کشاورزان انتخاب و معرفی شده‌اند و بالتبع این انتخاب مصنوعی توسط انسان روند تکامل یونجه در کشور را تحت تأثیر قرار داده است. در سال‌های گذشته، ارقام جدید خارجی نیز از برخی کشورهای غربی وارد ژرمپلاسسم یونجه کشور شده و مورد کشت و کار قرار گرفته‌اند. این عوامل در کنار ماهیت دگرگشن این گیاه، دلایل اصلی تنوع ژنتیکی بالای ژرمپلاسسم یونجه مورد بررسی در این مطالعه می‌باشند، حتی اگر ژرمپلاسسم مورد استفاده به‌طور کامل تنوع موجود در کشور را نشان ندهد. اگرچه نشانگرهای ریزماهوره نسبت به اسنپ‌ها (SNPs) فراوانی کمتری دارند، اما به لحاظ ماهیت چند آلی آن‌ها از توانایی تفکیک بیشتری در مقایسه با اسنپ‌ها با ماهیت دو آلی برخوردارند.

۵- نتیجه‌گیری

Science, 34(4), 1110–1112.

[5] Salmerón, J. I. C. (2002). Biotechnology and the Improvement of Forage Legumes. *Economic Botany*, 56(3), 291.

[6] Osborn, T. C., Brouwer, D., & McCoy, T. J. (1997). Molecular marker analysis of alfalfa. *Biotechnology and the Improvement of Forage Legumes*, 91–109.

[7] Diwan, Noa, Bhagwat, A. A., Bauchan, G. B., & Cregan, P. B. (1997). Simple sequence repeat DNA markers in alfalfa and perennial and annual *Medicago* species. *Genome*, 40(6), 887–895.

[8] Mengoni, A., Gori, A., & Bazzicalupo, M. (2000). Use of RAPD and microsatellite (SSR) variation to assess genetic relationships among populations of tetraploid alfalfa, *Medicago sativa*. *Plant Breeding*, 119(4), 311–317.

[9] Mohler, V., & Schwarz, G. (2004). Genotyping tools in plant breeding: from restriction fragment length polymorphisms to single nucleotide polymorphisms. In *Molecular marker systems in plant breeding and crop improvement* (pp. 23–38). Springer.

[10] Kidwell, K. K., Austin, D. F., & Osborn, T. C. (1994). RFLP evaluation of nine *Medicago* accessions representing the original germplasm sources for North American alfalfa cultivars. *Crop Science*, 34(1), 230–236.

[11] Falahati-Anbaran, M., Habashi, A. A., Esfahany, M., Mohammadi, S. A., & Ghareyazie, B. (2007). Population genetic structure based on SSR markers in alfalfa (*Medicago sativa* L.) from various regions contiguous to the centres of origin of the species. *Journal of Genetics*, 86(1), 59–63.

[12] Qiang, H., Chen, Z., Zhang, Z., Wang, X., Gao, H., & Wang, Z. (2015). Molecular diversity and population structure of a worldwide collection of cultivated tetraploid alfalfa (*Medicago sativa* subsp. *sativa* L.) germplasm as revealed by microsatellite markers. *PLoS ONE*, 10(4), 1–12.

[13] Flajoulot, S., Ronfort, J., Baudouin, P., Barre, P., Huguet, T., Huyghe, C., & Julier, B. (2005). Genetic diversity among alfalfa (*Medicago sativa*) cultivars coming from a breeding program, using SSR markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 111(7), 1420–1429.

[14] Zaccardelli, M., Gnocchi, S., Carelli, M., &

برای تسهیل تمایز و تفکیک توده‌های یونجه مورد نظر، ژرم پلاسِم مذکور از طریق نمونه‌های تصادفی حاوی حداقل ۱۰۰ بذر از هر توده و با استفاده از ۹ جایگاه ریزماهواره به وضوح تفکیک شدند. نتایج این بررسی نشان داد: توده‌های خارجی تفاوت‌های ژنتیکی معنی‌داری با سایر توده‌ها داشته و به میزان زیادی متمایزاند؛ توده 26-Y اختلاط بیشتری با توده‌های خارجی داشته و به عبارت دیگر ارتباطات ژنتیکی نزدیک‌تری با آنها دارد؛ توده 25-B و 29-N تفاوت‌های ژنتیکی کمتری با توده 26-Y دارد که این می‌تواند حاکی از وجود اجداد مشترک یا ارتباط ژنتیکی نزدیک بین آنها باشد؛ توده‌های 9-H، 27-G، 21-R، 2-G و 5-B شباهت‌های ژنتیکی بیشتری با یکدیگر دارند. این توده‌ها نیز ممکن است دارای یک ریشه ژنتیکی مشترک یا تاریخچه ژنتیکی مشابه باشند. روش پیشنهادی در این مطالعه به سادگی و در مدت کوتاه (یک تا دو روز) امکان شناسایی توده یونجه مورد نظر را بدون نیاز به استخراج DNA از برگ فراهم می‌کند.

قدردانی و تشکر

بدینوسیله از شرکت پاکان بذر که تامین مواد اولیه گیاهی مرجع و همچنین تامین مالی این پروژه را به عهده داشتند کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

۶- منابع

[1] Tesfaye, M., Silverstein, K. A. T., Bucciarelli, B., Samac, D. A., & Vance, C. P. (2006). The Affymetrix *Medicago* GeneChip® array is applicable for transcript analysis of alfalfa (*Medicago sativa*). *Functional Plant Biology*, 33(8), 783–788.

[2] Ministry of Jihad Keshavarzi, Iran. <https://maj.ir/page-amar/FA/65/form/pld3352>.

[3] بوشهری، ع. ا. ش. ن.، فتاحی، ح.، & صمدی، ب. ی.

(۲۰۰۸). بررسی تنوع ژنتیکی ارقام و توده‌های یونجه‌های

(*Medicago sativa*) تحت کشت در ایران با استفاده از

نشانه‌های RAPD. فصلنامه علمی ژنتیک نوین، ۳(۳)، ۰.

[4] Brown, D. E., & Bingham, E. T. (1994). Selfing in an alfalfa seed production field. *Crop*

marker and its utility in genetic evaluation of sugarcane. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 20, 313–321.

[25] Hu, J., Wang, L., & Li, J. (2011). Comparison of genomic SSR and EST-SSR markers for estimating genetic diversity in cucumber. *Biologia Plantarum*, 55, 577–580.

[26] Eujayl, I., Sorrells, M. E., Baum, M., Wolters, P., & Powell, W. (2002). Isolation of EST-derived microsatellite markers for genotyping the A and B genomes of wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 104, 399–407.

[27]

<https://www.marketdataforecast.com/market-reports/alfalfa-seeds-market>. (2023). Global Alfalfa Seeds Market Research Report - Segmentation By Type (Dormant Seed, Non-Dormant Seed), Variety (Open Pollinated, Hybrids), and Region - Industry Analysis, Share, Growth and Forecast 2022 to 2027.

[28] Annicchiarico, P., Nazzicari, N., Ananta, A., Carelli, M., Wei, Y., & Brummer, E. C. (2016). Assessment of Cultivar Distinctness in Alfalfa: A Comparison of Genotyping-by-Sequencing, Simple-Sequence Repeat Marker, and Morphophysiological Observations. In *The Plant Genome* (Vol. 9, Issue 2).

[29] Diwan, N., Bouton, J. H., Kochert, G., & Cregan, P. B. (2000). Mapping of simple sequence repeat (SSR) DNA markers, diploid and tetraploid alfalfa. *Theoretical and Applied Genetics*, 101(1–2), 165–172.

[30] Eujayl, I., Sledge, M. K., Wang, L., May, G. D., Chekhovskiy, K., Zwonitzer, J. C., & Mian, M. A. R. (2004). *Medicago truncatula* EST-SSRs reveal cross-species genetic markers for *Medicago* spp. *Theoretical and Applied Genetics*, 108(3), 414–422.

[31] Salimi, H., Bahar, M., Mirloh, A., & Talebi, M. (2016). Assessment of the genetic diversity among potato cultivars from different geographical areas using the genomic and EST microsatellites. *Iranian Journal of Biotechnology*, 14(4), 270–277.

[32] Julier, B., Flajoulot, S., Barre, P., Cardinet, G., Santoni, S., Huguet, T., & Huyghe, C. (2003). Construction of two genetic linkage maps in cultivated tetraploid alfalfa (*Medicago sativa*) using microsatellite and AFLP markers. *BMC Plant Biology*, 19(3), 1–19.

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(1), 61–65.

[15] Abdollahi Mandoulakani, B., Piri, Y., Darvishzadeh, R., Bernoosi, I., & Jafari, M. (2012). Retroelement insertional polymorphism and genetic diversity in *Medicago sativa* populations revealed by IRAP and REMAP markers. *Plant Molecular Biology Reporter*, 30, 286–296.

[16] Mason, A. S. (2015). SSR genotyping. *Methods in Molecular Biology*, 1245, 77–89.

[17] Wang, Z., Weber, J. L., Zhong, G., & Tanksley, S. D. (1994). Survey of plant short tandem DNA repeats. *Theoretical and Applied Genetics*, 88, 1–6.

[18] Brummer, E. C., Kochert, G., & Bouton, J. H. (1991). RFLP variation in diploid and tetraploid alfalfa. *Theoretical and Applied Genetics*, 83, 89–96.

[19] Echt, C. S., Kidwell, K. K., Knapp, S. J., Osborn, T. C., & McCoy, T. J. (1994). Linkage mapping in diploid alfalfa (*Medicago sativa*). *Genome*, 37(1), 61–71.

[20] Kiss, G. B., Csanádi, G., Kálmán, K., Kaló, P., & Ökrész, L. (1993). Construction of a basic genetic map for alfalfa using RFLP, RAPD, isozyme and morphological markers. *Molecular and General Genetics MGG*, 238, 129–137.

[21] Varshney, R. K., Nayak, S. N., May, G. D., & Jackson, S. A. (2009). Next-generation sequencing technologies and their implications for crop genetics and breeding. *TRENDS in Biotechnology*, 27(9), 522–530.

[22] Cordeiro, G. M., Casu, R., McIntyre, C. L., Manners, J. M., & Henry, R. J. (2001). Microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* spp.) ESTs cross transferable to *erianthus* and *sorghum*. *Plant Science*, 160(6), 1115–1123.

[23] Pinto, L. R., Oliveira, K. M., Marconi, T., Garcia, A. A. F., Ulian, E. C., & De Souza, A. P. (2006). Characterization of novel sugarcane expressed sequence tag microsatellites and their comparison with genomic SSRs. *Plant Breeding*, 125(4), 378–384.

[24] Kalwade, S. B., & Devarumath, R. M. (2014). Single strand conformation polymorphism of genomic and EST-SSRs

of cluster analysis. *Journal of Computational and Applied Mathematics*, 20, 53–65.

[38] Riday, H., Brummer, E. C., Campbell, T. A., Luth, D., & Cazcarro, P. M. (2003). Comparisons of genetic and morphological distance with heterosis between *Medicago sativa* subsp. *sativa* and subsp. *falcata*. *Euphytica*, 131, 37–45.

[39] Ellwood, S. R., 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.

[40] مقدم، و.ع. (۱۳۸۲). حفاظت شدگی و توانایی ایجاد پلی مورفیسم میکروساتلایت‌های در تعدادی از گونه‌های مرتعی و خانواده Leguminosae ایران. پایان نامه. دانشگاه صنعتی اصفهان.

<https://doi.org/10.1186/1471-2229-3-9>

[33] Liu, Z., & Wang, Y. (2013). Global Illumina sequencing and the development of EST-SSR markers in alfalfa. 335–336.

[34] Liu, W., Jia, X., Liu, Z., Zhang, Z., Wang, Y., Liu, Z., & Xie, W. (2015). Development and characterization of transcription factor gene-derived microsatellite (TFGM) markers in *medicago truncatula* and their transferability in leguminous and non-leguminous species. *Molecules*, 20(5), 8759–8771.

[35] Clark, L. V., & Jasieniuk, M. (2011). polysat: An R package for polyploid microsatellite analysis. *Molecular Ecology Resources*, 11(3), 562–566. <https://doi.org/10.1111/j.17550998.2011.02985.x>

[36] Bruvo, R., Michiels, N. K., D'SOUZA, T. G., & Schulenburg, H. (2004). A simple method for the calculation of microsatellite genotype distances irrespective of ploidy level. *Molecular Ecology*, 13(7), 2101–2106.

[37] Rousseeuw, P. J. (1987). Silhouettes: a graphical aid to the interpretation and validation

Molecular Identification of Plant Seed Accessions Using Bulk Seed Samples: A Case Study on Alfalfa

Mojtaba Khayam Nekouei

Associate Professor, Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

khayam@modares.ac.ir

Receipt: 2024/07/09

Accepted: 2024/11/2

Abstract

Iran stands out as a significant center of genetic diversity for alfalfa (*Medicago sativa*) worldwide, harboring diverse types of this plant. Ensuring the authenticity of alfalfa populations and varieties is crucial for farmers and seed producers, as the genetic makeup of this species directly influences forage and seed yield quality. In this study, we developed a method to identify and differentiate key Iranian cultivated alfalfa populations using microsatellite markers. We collected random samples, each containing 100 seeds, from various alfalfa accessions. Nine microsatellite loci were screened and employed to differentiate these populations based on specific allelic genotypes. Notably, the MTIC233, BI90, ACT009, TC7, MTIC183, MS30, MTIC238, and AFCA11 markers exhibited the highest differentiation ability. The genetic distance analysis revealed that 5-B and foreign accessions, as well as 29-N and foreign accessions, were the most distant from each other. Conversely, 27-G, 9-H, and 21-R exhibited the closest genetic similarity. The results revealed that, accessions 9-H, 21-R, 27-G, 25-B, 5-B, and 2-G shared a common genetic background, suggesting their close relatedness. Our proposed method allows straightforward identification of target alfalfa accessions within a short timeframe (one to two days) without the need for DNA extraction from leaves.

Keyword: Alfalfa, SSR, Microsatellite, Bulk seed, Genetic identification, Authentication, Molecular marker