

ارتباط نشانگرهای آنزیمی با صفات کمی در خانواده‌های ناتنی یونجه

حسین محمدزاده جلالی، مصطفی ولیزاده*، محمد مقدم و مریم احمدی

گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، ایران

چکیده

به منظور ارزیابی ارتباط بین صفات کمی و نشانگرهای آنزیمی، ۱۲ خانواده ناتنی یونجه حاصل از خزانه پلی کراس از نظر ویژگی‌های زراعی و نشانگرهای آنزیمی مربوط به همان بوته‌ها، در ایستگاه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز بررسی شد. تعداد ۳۵ بوته از هر خانواده در گلدان‌های مجزا به صورت طرح کاملاً تصادفی در شرایط مزرعه‌ای کشت شدند. دو آنزیم استراز و پراکسیداز توسط ژل‌های اکرلامید افقی تجزیه شدند. تجزیه‌های آماری صفات مختلف بر اساس تفسیر ایزوزیمی نشان داد که بین برخی ایزوزیم‌های پراکسیداز و ویژگی‌های گیاهیچه‌ای ارتباط معنی‌داری وجود دارد و در بیشتر موارد وجود نوار باعث افزایش ارزش این صفات شد. علاوه بر این، ایزوزیم POX-4 با وزن خشک برگ ارتباط معنی‌داری نشان داد. تجزیه آماری صفات مختلف بر اساس تفسیر آلوزیمی نشان داد که آلوزیم‌های EST-b1 و POX-b2 با هر دو صفت عملکرد و تعداد میانگرمه همبستگی معنی‌دار و مثبتی دارند. بنابراین، به نظر می‌رسد که می‌توان در صورت تأیید پایداری نشانگرها از آنها در تحقیقات آینده برای استفاده در برنامه‌های اصلاحی یونجه استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: خانواده‌های ناتنی یونجه، ویژگی‌های زراعی، نشانگرهای آنزیمی، همبستگی

مقدمه

حاصل از برنامه‌های اصلاحی در یونجه به علت پیچیدگی ساختار ژنتیکی آن نسبت به گیاهان دیگر چندان چشمگیر نبوده است (Mengoni et al., 2000)، به طوری که اصلاح گونه‌هایی نظیر ذرت در چند دهه اخیر به افزایش عملکرد در حدود ۲ درصد در سال منجر شده، در حالی که افزایش عملکرد در گیاهان علوفه‌ای به ویژه لگوم‌ها در حدود ۰/۳ درصد در سال بوده است

یونجه با دارا بودن ساختار ژنتیکی اتوتتراپلوئیدی ($2n=4x=32$) و دگرگشنی، تنوع بالایی از نظر ویژگی‌های ریخت‌شناختی و زراعی دارد که این تنوع بالا، شناسایی رقم‌های مختلف بر اساس ویژگی‌های زراعی و ریخت‌شناختی را مشکل می‌کند (Morales Corts and Crespo Martines, 2000). پیشرفت‌های

نیز بر این باورند که نشانگرهای مولکولی بیشتر تنوع افراد را از نظر بخش غیره رمز کننده ژنوم مشخص می‌کنند (Beyene *et al.*, 2005). با وجود این، باید در نظر داشت که روش‌های مولکولی و ریخت‌شناختی هر کدام دارای مزایا و معایب خاص خود هستند (Mohammadi and Prasanna, 2003). از سوی دیگر، پی بردن به ارتباط بین داده‌های مولکولی و ریخت‌شناختی می‌تواند در کارهای اصلاحی اهمیت داشته باشد، زیرا بیشتر صفات ریخت‌شناختی به صورت چند ژنی کنترل می‌شوند، در حالی که تفاوت اساسی صفات کمی با کیفی در تعداد ژن‌های مؤثر بر گوناگونی فنوتیپ و در میزان تغییرپذیری فنوتیپ در پاسخ به عوامل محیطی نهفته است. چنان که عنوان شد معمولاً صفات ریخت‌شناختی توسط تعداد زیادی ژن تنظیم می‌شود و سهم هر ژن در فنوتیپ به اندازه‌ای کم است که نمی‌توان آن را با روش‌های مندلی تشخیص داد (Stansfield, 1991). علاوه بر این، اطلاعات ژنتیکی حاصل از صفات ریخت‌شناختی اغلب محدود هستند که این موضوع استفاده از آنها را در بررسی جوامع گیاهی با محدودیت‌هایی همراه کرده است. پژوهشگران برای رفع این نواقص از نشانگرهای مولکولی استفاده می‌کنند. بیشتر نشانگرهای DNA در تمام بافت‌ها بدون توجه به رشد، تکوین و وضعیت سلول ثابت هستند و تحت تأثیر محیط، آثار پلوتروپیک و آثار اپیستازی نیستند (Agarwal *et al.*, 2008). Habibi و همکاران (۲۰۱۲) با استفاده از نشانگرهای ISSR، ۱۸ ژنوتیپ یونجه را مطالعه کردند و با محاسبه تفاوت ژنتیک بین ژنوتیپ‌ها سه گروه مجزا به دست آوردند. برخی پژوهشگران همزمان با استفاده از نشانگرهای مبتنی بر DNA، از

(Brummer, 1999). با توجه به جایگاه یونجه در بین گیاهان زراعی، چنین بررسی‌هایی به ویژه در ایران که به عنوان یکی از نخستین زیستگاه‌های یونجه معرفی شده است و توده‌های محلی متنوعی دارد، حایز اهمیت است. از صفات ریخت‌شناختی به طور وسیع برای تعیین میزان تنوع ژنتیک در یونجه استفاده شده است. Monirifar و همکاران (۲۰۰۴) ۲۸ توده بومی و دو رقم اصلاح شده یونجه را با استفاده از ۹ صفت ریخت‌شناختی بررسی و برای بیشتر صفات تنوع معنی‌داری گزارش کردند. Fareghi و همکاران (۲۰۰۷) جمعیت‌های یونجه را از نظر عناصر غذایی و ترکیبات شیمیایی مطالعه کردند. تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بر اساس عناصر و ترکیبات شیمیایی نشان داد که درصد پروتئین خام و درصد کلسیم تنوع بیشتری در بین صفات دارند. Davodi و همکاران (۲۰۱۱) با بررسی ۲۰۰ بوته یونجه از نظر عملکرد علوفه و صفات مربوط به کیفیت علوفه، بیان کردند که گزینش بر اساس صفات مربوط به کیفیت علوفه می‌تواند در افزایش عملکرد علوفه مفید باشد. یکی از مسائلی که در اصلاح نباتات به آن توجه می‌شود، نقش، اهمیت و کارایی هر یک از صفات ریخت‌شناختی و مولکولی در تعیین سطح تنوع ژنتیکی و برآورد روابط بین افراد، ژنوتیپ‌ها و جمعیت‌هاست. در رابطه با این که آیا داده‌های حاصل از ارزیابی‌های ریخت‌شناختی و مولکولی از نظر توارثی منبع اطلاعاتی بهتر و مناسب‌تری در این زمینه است، اختلاف نظر وجود دارد. برخی معتقدند که تعیین تنوع تنها بر اساس اطلاعات ریخت‌شناختی گمراه کننده و فاقد اطلاعات کافی برای برآورد روابط بین ژنوتیپ‌ها و یا جمعیت‌ها برای استفاده در مطالعات کاربردی است و برخی دیگر

مواد و روش‌ها

این پژوهش در سال زراعی ۱۳۸۹ در ایستگاه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز واقع در اراضی کرکج در ۱۲ کیلومتری شرق تبریز با ارتفاع ۱۳۶۱ متر از سطح دریا به اجرا شد. در این پژوهش ۱۲ خانواده برادر-خواهر ناتنی یونجه ارزیابی و مطالعه شد. این خانواده‌های ناتنی از خزانه پلی کراس حاصل از یک برنامه ملی تحقیقاتی برای اصلاح و معرفی مناسب‌ترین رقم‌های یونجه در منطقه آذربایجان (Valizadeh و همکاران، ۲۰۰۲) تهیه شدند. جدول ۱ اسامی و منشأ خانواده‌ها را نشان می‌دهد. برای ارزیابی ژنوتیپ‌ها از طرح پایه کاملاً تصادفی استفاده شد. برای این منظور، تعداد ۳۵ بوته از هر جمعیت در داخل گلدان‌هایی به ابعاد ۲۵×۲۰×۱۵ سانتی‌متر به شکل انفرادی در شرایط مزرعه کاشته شد. برای یکنواخت کردن شرایط، خاک گلدان‌ها به ترتیب با نسبت‌های ۲:۱:۱ خاک، کود دامی و ماسه پر شد. در هر گلدان چند بذر کشت شد، اما پس از سبز شدن آنها در هر گلدان تنها یک بوته برای ارزیابی‌های مزرعه‌ای و بررسی‌های مولکولی نگهداری شد.

نشانگرهای آنزیمی نیز در تجزیه نمونه‌های گیاهی خود استفاده کرده‌اند. Chandra (۲۰۱۰) تعداد ۱۹۷ فرد از ۵۰ گونه یونجه را از طریق ۱۷ نشانگر SSR و ۷ سیستم آنزیمی را مطالعه و گزارش کرد که دو گونه *Medicago doliata* و *M. scutellata* هم از نظر نشانگرهای SSR و هم از نظر آنزیمی بیشتر از سایر گونه‌ها به هم شباهت دارند. Jenczewski و همکاران (۱۹۹۹a, b) تعداد ۳۶ فرد از هر کدام از ۱۵ جمعیت خودرو و ۶ رقم زراعی یونجه را به کمک ۲۵ نشانگر RAPD و پنج مکان ژنی آلوزیمی مطالعه و گزارش کردند که علیرغم پایین تر بودن تنوع ژنی درون جمعیتی برآورد شده از طریق نشانگر RAPD در مقایسه با نشانگر آلوزیمی، الگوی ساختار جمعیتی برآورد شده از طریق دو نشانگر فوق با همدیگر مطابقت دارد. بنابراین، ارتباط دادن صفات کمی با نشانگرهای مولکولی که وراثت تک‌ژنی دارند و کمتر تحت تأثیر عوامل محیطی قرار می‌گیرند، می‌تواند تأثیر به‌سزایی در روند شناسایی و گزینش رقم‌های با عملکرد بالا داشته باشد. هدف از پژوهش حاضر یافتن ارتباط بین ویژگی‌های زراعی و نشانگرهای آنزیمی به منظور کاربرد در برنامه‌های اصلاحی یونجه است.

جدول ۱- اسامی و منشأ خانواده‌های ناتنی یونجه مطالعه شده

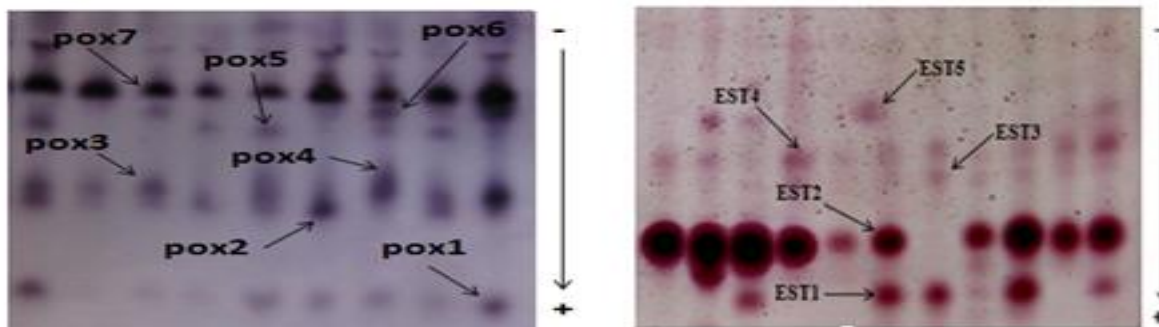
خانواده‌های ناتنی	منشأ و ماخذ	خانواده‌های ناتنی	منشأ و ماخذ
قره یونجه	مراغه	شازند	اراک
گله‌بانی	مرند	سلوانا	ارومیه
لیلان حمید	اراک	زغال اغاج	تبریز
مامان فامنین	همدان	چالشته	چهارمحال و بختیاری
عمو زین‌الدین	تبریز	رنجر	اصلاح شده خارجی
تازه کند	نقده	مائوپا	اصلاح شده خارجی

در صورت عدم وجود امتیاز صفر (۰) دریافت کرد. افراد در داخل خانواده‌ها از نظر هر یک از نوارها به دو گروه واجد نوار و فاقد نوار تقسیم شدند. سپس، میانگین این دو گروه با هم مقایسه شد و برای بررسی ارتباط صفات زراعی و ریخت‌شناسی با نوارهای آلوزیمی نیز، همانند مکان EST-A که دو الل بود، سایر مکان‌ها (EST-B, POX-B و POX-C) نیز به صورت دو اللی در آورده شدند و همبستگی بین یک صفت با یک الل بیانگر همبستگی با علامت جبری متفاوت با گروه اللی دیگر نیز خواهد بود. با وجود این، به منظور تثبیت خطای نوع اول، ابتدا از آزمون T^2 هتلینگ در سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد. پیش از انجام آزمون T^2 هتلینگ نیز نرمال بودن توزیع هر یک از متغیرها توسط آزمون کولموکروف-اسمیرنوف در سطح احتمال ۱ درصد بررسی شد.

نتایج و بحث

برای تعیین ارتباط صفات زراعی و ریخت‌شناختی با نوارهای ایزوزیمی (شکل ۱)، نوارهای آنزیمی به شکل دو گروه بود و نبود (۰ و ۱) بررسی شدند. از ۱۲ ایزوزیم مشاهده شده (۵ ایزوزیم مربوط به آنزیم استراز و ۷ ایزوزیم مربوط به آنزیم پراکسیداز)، تنها پنج نوار ایزوزیمی با صفات ارتباط معنی‌داری داشتند. رابطه صفات کمی با نوارهای آنزیمی در جدول ۲ آمده است.

تجزیه‌های آنزیمی روی برگ‌های جوان با موقعیت مشخص انجام شد. برای استخراج آنزیم‌ها از محلول تریس (۱۲۰ میلی‌مولار)، سوکروز (۵ درصد)، آسکوربیک اسید (۵۰ میلی‌مولار)، سدیم متابی‌سولفیت (۲۰ میلی‌مولار) و PEG 6000 (۲ درصد) با اسیدیته ۷/۵ استفاده شد. پیش از استخراج، به محلول فوق ۲-مرکاپتواتانول به مقدار ۰/۱ درصد اضافه شد. به این منظور، یک واحد از برگ‌ها با دو واحد از بافر استخراج به خوبی همگن شدند. سپس، به مدت ۱۰ دقیقه در 10000 g و دمای 4°C درجه سانتیگراد سانتریفیوژ شدند (Valizadeh *et al.*, 2011). ژل‌های اکریلامید افقی به ضخامت ۶ میلی‌متر و غلظت ۷ درصد با استفاده از محلول ژل پولیک با عرض ۱۰ و طول ۲۰ سانتی‌متر تهیه شدند. پس از بارگذاری در مخزن، الکتروفورز با بافر تریس ۳۲ میلی‌مولار، بوریک اسید ۰/۶ میلی‌مولار، EDTA ۰/۱ میلی‌مولار با اسیدیته ۸/۸ انجام شد و ولتاژ منبع الکتریسیته روی ۱۹۶ ولت تنظیم شد. برای رنگ‌آمیزی آنزیم پراکسیداز از روش Olson و Varner (۱۹۹۳) و آنزیم استراز از دستورالعمل موجود در پژوهش Soltis و Soltis (۱۹۹۰) با اندکی تغییرات استفاده شد. برای تمایز خانواده‌های ناتنی یونجه و تعیین ارتباط صفات ریخت‌شناسی با نوارهای ایزوزیمی، هر نوار در صورت وجود امتیاز یک (۱) و



شکل ۱- نمونه‌ای از تفسیر ایزوزیمی در آنزیم استراز (سمت راست) و آنزیم پراکسیداز (سمت چپ) در خانواده قره یونجه

جدول ۲- ارتباط بین صفات زراعی و نوارهای ایزوزیمی در کل خانواده‌های ناتنی یونجه مطالعه شده. - بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار است.

ایزوزیم	ارتفاع بوته	تعداد ساقه فرعی	تعداد میانگره	عرض برگ لپه‌ای	طول برگ لپه‌ای	ارتفاع برگ لپه از خاک	طول نخستین میان گره	وزن خشک	وزن تر	وزن خشک برگ	نسبت وزن خشک برگ به ساقه
EST-1	۰	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EST-2	۰	۲۳	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	۱	۴۰/۵۵	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EST-3	۰	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	۱	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EST-4	۰	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	۱	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EST-5	۰	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	۱	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
POX-1	۰	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	۱	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
POX-2	۰	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	۱	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
POX-3	۰	-	-	-	-	۸/۳۳	-	-	-	-	-
	۱	-	-	-	-	۷/۶۱	-	-	-	-	-
POX-4	۰	-	-	-	۶/۸۱	-	-	-	-	۲/۲۰	-
	۱	-	-	-	۷/۱۶	-	-	-	-	۲/۴۰	-
POX-5	۰	-	-	-	۶/۹۲	-	-	-	-	-	-
	۱	-	-	-	۷/۳۴	-	-	-	-	-	-
POX-6	۰	-	-	۳/۱۲	-	-	-	-	-	-	-
	۱	-	-	۳/۵۰	-	-	-	-	-	-	-

صفات که عموماً با حضور نوار، اثرگذاری مثبت روی صفات نشان دادند، ایزوزیم POX-3 در حالت عدم حضور نوار باعث افزایش طول هیپوکوتیل شد. درباره صفت طول برگ لپه‌ای، این صفت با ایزوزیم‌های POX-4 و POX-5 ارتباط معنی دار و مثبت نشان دادند، به بیان دیگر، در هر دو ایزوزیم وجود نوار باعث افزایش طول برگ لپه‌ای شد. همچنین، POX-4 با صفت وزن خشک برگ ارتباط معنی داری نشان داد، که در صورت تداوم این ارتباط در پژوهش‌های دیگر می‌تواند به عنوان نشانگر مؤثری که ارتباط مستقیمی با صفت مهم گیاهان علوفه‌ای یعنی عملکرد دارد، به کار رود. POX-6 نیز با صفت عرض برگ

همان طور که ملاحظه می‌شود درباره ایزوزیم‌های استراز تنها EST-2 در کل خانواده‌های ناتنی با ارتفاع بوته ارتباط معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد داشت و وجود نوار آنزیمی باعث افزایش ارتفاع گیاه شد. سایر ایزوزیم‌های استراز ارتباط معنی داری با صفات مطالعه شده پیدا نکردند. درباره آنزیم پراکسیداز، با توجه به تک شکل بودن ایزوزیم POX-7 از تجزیه‌ها کنار گذاشته شد، همچنین، ایزوزیم‌های POX-1 و POX-2 هیچ نوع ارتباط معنی داری با صفات مطالعه شده نشان ندادند. در حالی که POX-3 با ارتفاع برگ لپه‌ای از خاک (طول هیپوکوتیل) رابطه معنی داری نشان داد. بر خلاف سایر ایزوزیم‌های معنی دار با

لیه‌ای ارتباط معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد نشان داد. Van و Jin (۲۰۱۱) در بررسی ارتباط بین صفات زراعی و آنزیم استراز در نسل F_۲ حاصل از تلاقی دو رقم برنج، تعدادی آنزیم مرتبط با صفات عملکرد و اجزای عملکرد در برنج گزارش کردند. ایزوزیم EST-2 با تعداد سنبلیچه در خوشه و تعداد شاخه‌های ثانویه خوشه و ایزوزیم‌های PGI-2 و AMP-3 با صفات تعداد سنبلیچه در خوشه و تعداد شاخه‌های ثانویه در ارتباط هستند. Singh و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کردند که حرکت نسبی نوارهای پراکسیداز و استراز با ارتفاع بوته در ارتباط است. به طوری که ایزوزیم‌های پراکسیداز با حرکت نسبی ۰/۸۴ تا ۰/۹۰ در گیاهان با ارتفاع بوته بلند و ایزوزیم‌هایی با حرکت نسبی پایین‌تر از ۰/۶۰ در گیاهانی با ارتفاع بوته کوتاه دیده شدند، به عبارت دیگر، گیاهانی که ارتفاع بوته بلندتری داشتند فاقد نوارهایی با حرکت نسبی ۰/۶۰ و پایین‌تر از آن بودند. درباره آنزیم استراز نیز گزارش کردند که نوارهای ایزوزیمی با حرکت نسبی بالاتر در گیاهانی که ارتفاع بوته اندکی دارند دیده نشد، به این معنی که وجود این نوارهای ایزوزیمی با افزایش ارتفاع بوته همراه بوده است (Singh et al., 2009).

برای تعیین ارتباط صفات زراعی و ریخت‌شناختی با نوارهای آلوزیمی (شکل ۲)، دو مکان ژنی چندشکل برای آنزیم استراز (EST-a و EST-b) و همچنین، دو مکان ژنی چندشکل برای آنزیم پراکسیداز (POX-b) و (POX-c) و یک مکان ژنی تک‌شکل (POX-a) به دست آمد. مقایسه ارتباط صفات کمیپ با نوارهای

آلوزیمی در جدول ۳ آمده است. تعداد میانگرمه با نوارهای EST-a1 و POX-b2 در سطح احتمال ۵ درصد و نوار EST-b1 در سطح احتمال ۱ درصد همبستگی معنی‌داری نشان دادند. به عبارت دیگر، وجود نوارهای فوق در مکان ژنی مربوط (در هر آلوزیم) سبب افزایش تعداد میانگرمه در بوته خواهند شد. نوار EST-b3 آلوزیم EST-B با صفت طول نخستین میانگرمه همبستگی مثبت و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد نشان داد. صفت وزن تر و وزن خشک برگ با نوار EST-b1 همبستگی معنی‌داری نشان داد. علاوه بر این، صفت وزن تر با نوار POX-b2 نیز در سطح احتمال ۱ درصد همبستگی بالایی را نشان داد. به عبارت دیگر می‌توان گفت، وجود نوارهای POX-b2 و ETS-b1 در آلوزیم‌های مربوط باعث افزایش وزن تر بوته خواهد بود. پژوهشگران متعددی ارتباط تغییرات فراوانی آلوزیم‌ها با صفات زراعی و عوامل محیطی را بررسی کرده‌اند. Valizadeh (۱۹۷۸) در درختان انجیر (*Ficus carica*) نشان داد که بین یک آلوزیم فسفاتاز اسید و رسیدگی میوه همبستگی معنی‌داری وجود دارد. Stuber و همکاران (۱۹۸۰) گزارش کردند همبستگی بسیار قوی بین آلوزیم ACP-1 و عملکرد وجود دارد. Pollak و همکاران (۱۹۸۴) نیز بیان کردند که آلوزیم‌های ADH-1، POX-1 و GOT-1 به ویژه با ACP-1 با عملکرد و زودرسی گیاه ذرت و به ویژه با تعداد برگ‌ها ارتباط دارند. Mittal و همکاران (۱۹۹۳) با بررسی فعالیت آنزیمی اسید فسفاتاز بر روی هشت رقم ماش سبز (*Vigna radiate L.*) گزارش کردند که فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز همبستگی مثبتی با وزن صد

جمع‌بندی

با توجه به نتایج به دست آمده از همبستگی معنی‌دار بین برخی از آنزیم‌های پراکسیداز و استراز با صفات بیوماس هوایی و سایر صفات ریخت‌شناسی که جزو صفات مهم در گیاهان علوفه‌ای محسوب می‌شود و در صورت تأیید این ارتباط در پژوهش‌های دیگر و همچنین، با استفاده از نشانگرهای مبتنی بر DNA می‌توان از نشانگرهای یاد شده و همبستگی ارتباط بین آنها در

راستای برنامه‌های بهبود عملکرد و افزایش میزان بیوماس گیاهان علوفه‌ای به ویژه گیاه یونجه استفاده کرد.

سپاسگزاری

نگارندگان لازم می‌دانند که از گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی دانشگاه تبریز و تمام دوستانی که در آزمایشگاه سیتوژنتیک دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز یاری نمودند تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

- Agarwal, M., Shrivastava, N. and Padh, H. (2008) Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports* 27: 617-631.
- Beyene, Y., Botha, A. and Myburg, A. (2005) A comparative study of molecular and morphological methods of describing genetic relationships in traditional Ethiopian highland maize. *African Journal of Biotechnology* 4: 586-595.
- Brummer, E. C. (1999) Capturing heterosis in forage crop cultivar development. *Crop Science* 39: 943-954.
- Chandra, A. (2010) Studies on morphological and genetical similarities of *M. murex* and *M. doliata* to *M. scutellata*. *Journal of Environmental Biology* 31(5): 803-808.
- Davodi, M., Jafari, A. A., Assadian, G. and Ariapour, A. (2011) Assessment of relationships among yield and quality traits in alfalfa (*Medicago sativa*) under dryland farming system, Hamadan, Iran. *Journal of Rangeland Science* 3: 247-254.
- Driedger, D. R., Watts, B. M., Hussain, A. and Elias, L. B. (1994) Isoenzyme and cotyledon protein variation for identification of black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) with similar seed morphology. *Euphytica* 74: 27-34.
- Fareghi, S. H., Farshadfar, M. and Farshadfar, E. (2007) Study of chemical composition and nutrition value of preennial Lucerne (*Medicago sativa* L.) and genetic diversity based on SDS-PAGE markers. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research* 15(3): 196-210 (in Persian).
- Habibi, B., Farshadfar, M. and Safari, H. (2012) Evaluation of genetic diversity in 18 genotypes of alfalfa (*Medicago sativa*) using of molecular ISSR markers. *International Journal of Agriculture and Crop Science* 4: 1573-1578.
- Jenczewski, E., Prosperi, J. M. and Ronfort, J. (1999a) Evidence for gene flow between wild and cultivated *Medicago sativa* (Leguminosae) based on allozyme markers and quantitative traits. *Botany* 86: 677-687.
- Jenczewski, E., Prosperi, J. M. and Ronfort, J. (1999b) Differentiation between natural and cultivated populations of *Medicago sativa* (Leguminosae) from Spain: analysis with random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and comparison to allozymes. *Molecular Ecology* 8: 1317-1330.
- Kahler, A. L. (1983) Elect of half-sib and S1 recurrent selection for increased grain yield on allozyme polymorphisms in maize (*Zea mays* L.). *Crop Science* 23: 572-576.
- Lopez, M. T. and Virmany, S. S. (1990) Association of some isozyme markers with

- quantitative traits in rice. Retrieved from http://archive.gramene.org/newsletters/rice_genetics/rgn7/v7p128.html. On: 8 March 2013.
- Mengoni, A., Gori, A. and Bazzicalpo, M. (2000) Use of RAPD and of tetraploid microsatellite (SSR) variation to assess genetic relationships among population of tetraploid alfalfa. *Plant Breeding* 119: 311-317.
- Mittal, R. K., Singh, M., Maherchandani, N. and Sethi, G. S. (1993) Enzyme activities and their correlation with seed yield and its components in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *Annals of Biology* 9: 218-223.
- Mohammadi, S. A. and Prasanna, B. M. (2003) Analysis of genetic diversity in crop plants salient statistical tools and considerations. *Crop Science* 43: 1235-1248.
- Monirifar, H., Valizadeh, M. and Mogaddam, M. (2004) Inheritance of yield and morphological traits in Iranian alfalfa germplasm. *Pajouhesh and Sazandegi* 62: 96-102 (in Persian).
- Morales Cortes, M. R. and Crespo Martinez, M. C. (2000) Variation of PGM and IDH isozymes for identification of alfalfa varieties. *Euphytica* 112: 137-143.
- Olson, P. D. and Varner, J. E. (1993) Hydrogen peroxides and lignifications. *Plant Journal* 4: 887-892.
- Pollak, L. M., Gardner, C. O. and Parkhurst, A. M. (1984) Relationships between enzyme marker loci and morphological traits in two mass selected maize populations. *Crop Science* 24: 174-179.
- 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*. 1st edition, Chapman and Hall, London.
- Stansfield, W. D. (1991) Schavm's outline of theory and problems genetics. 3th edition, McGraw-Hill Companies, Inc., New York.
- Stuber, C. W., Moll, R. H., Goodman M. M., Schaler, H. and Weir, B. S. (1980) Allozyme frequency changes associated with selection for increased grain yield in maize. *Genetics* 95: 225-236.
- Valizadeh, M. (1978) Existence d'une relation entre les allozymes d'une phosphatase acide et la precocite de la fructification chez le figure (*Ficus carica* L.). *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences* 1881-1884.
- Valizadeh, M., Moghaddam, M., Talebi, P., Kazemi, M. H., Monirifar, H. and Hassanpanah, D. (2002) Breeding and Introduction of suitable alfalfa cultivars in East-Azarbaijan. University of Tabriz Research Affairs, Tabriz, Iran (in Persian).
- Valizadeh, M., Mohayjeji, M., Yasinzadeh, N., Nasrullazadeh, S. and Moghaddam, 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, D. X. and Jin, 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.

Interrelationships of quantitative traits and isozymic markers in alfalfa half-sib families

**Hossein Mohammadzadeh Jalaly, Mostafa Valizadeh *, Mohammad Moghaddam
and Maryam Ahmadi**

Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

Abstract

In this study, the relationships between some quantitative traits and enzyme markers in 12 half-sib families of alfalfa resulted from polycross nursery, were investigated in the Agricultural Research Station of University of Tabriz. First, thirty five individuals of each family were grown in separate pots in the form of completely randomized design at field conditions and then, they were analyzed for two enzymatic system by slab acrylamide gels. Statistical analysis of different data based on isozyme interpretation showed that there were a significant relationships between peroxidase and seedling traits. In addition, the presence of a band increased the mean values of related traits. Furthermore, POX-4 isozyme showed a significant relationship with respect to leaf weight. Statistical analysis of the studied traits based on allozyme interpretation showed that EST-b1 and POX-b2 had a positive correlation with both yield and number of internodes. Thus, it might be possible to use these enzymes as markers to select alfalfa genotypes in the early breeding stages after the stability of markers were verified in other experiments.

Key words: Alfalfa half-sib families, Agronomic traits, Enzymatic markers, Correlation

* Corresponding Author: mvalizadeh@tabrizu.ac.ir