مجله به‌نژادی نهال و بذر
جلد ۱-۲۸ ، شماره ۳، سال ۱۳۹۱

تنوع ژنتیکی جمعیت‌های وحشی ایرانی یونجه *Medicago sativa* بر اساس پروتئین‌های کل و تعیین ارتباط آن با عوامل اکولوژیکی

Genetic Diversity of Iranian Wild *Medicago sativa* Populations Based on Total Proteins and its Association with Ecological Factors

پریسا صالحی[۱]، پروین صالحی‌شانجانی[۲]، علی اشرف‌جعفری[۳] و غلامرضا بخشی‌خانیکی[۴]

۱ و ۴- به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استاد، دانشگاه پیام نور، کرج
۲ و ۳- به ترتیب استادیار و دانشیار، موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۵/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱۱/۲۷

چکیده

صالحی، پ.، صالحی شانجانی، پ.، جعفری، ع. ا. و بخش خانیکی، غ. ۱۳۹۱. تنوع ژنتیکی جمعیت‌های وحشی ایرانی یونجه *Medicago sativa* بر اساس پروتئین‌های کل و تعیین ارتباط آن با عوامل اکولوژیکی. **مجله به‌نژادی نهال و بذر ۱-۲۸:** ۴۸۰ - ۴۶۳.

برای بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های وحشی ایرانی یونجه (*Medicago sativa* L.) و تعیین ارتباط آن با عوامل اکولوژیکی، الگوی پروتئینی ۲۱۰ ژنوتیپ از ۲۱ جمعیت بذری یونجه موجود در بانک ژن منابع طبیعی بررسی شد. کلیه مراحل تحقیق در سال ۱۳۸۹ در گلخانه تحقیقاتی و آزمایشگاه ارزیابی ملکولی بانک ژن موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع انجام شد. بر اساس نتایج SDS-PAGE، ۴۴ باند قابل تکثیر، پپتید پروتئینی، برای مطالعه تنوع ژنتیکی ثبت شد. الگوی پروتئین‌های کل جمعیت‌های مورد بررسی تنوع درون و بین جمعیتی بالایی نشان دادند ولی تمایز مشخصی بر اساس منشاء و رویشگاه آن‌ها مشاهده نشد. همبستگی بین ماتریس‌های فاصله‌های ژنتیکی و جغرافیایی نیز به وسیله آزمون مانتل به اثبات نرسید (P=۰/۱۰ و R=۰/۰۲۸۱). برای بررسی رابطه بین عوامل ژنتیکی و اکولوژیکی و محیطی که شامل میانگین کل و ماهانه بارندگی (میلی‌متر)، میانگین بیشینه و کمینه دما (درجه سانتی‌گراد) و ارتفاع از سطح دریا (متر) بود از ضریب همبستگی پیرسون استفاده شد. نتایج نشان داد که افزایش ارتفاع از سطح دریا با کاهش تعداد باندها و تعداد باندهای با فراوانی مساوی یا بیشتر ۵٪، همراه بود. از آن‌جایی که ایران مرکز تنوع گونه یونجه است، چنین تنوع بالایی در ویژگی‌های مختلف این گیاه دور از انتظار نیست، بنابراین در برنامه‌های به‌نژادی یونجه می‌بایست تنوع ژنتیکی ارقام یونجه به وسیله استفاده از والدین مختلف افزایش یابد. افزایش اساس ژنتیکی برای اصلاح یونجه می‌تواند به وسیله کاربرد سیستماتیکی ژرم‌پلاسم که الگو پروتئینی متفاوتی داشته و ویژگی‌های کمی بهتری دارند حاصل شود.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، پروتئین‌های کل، عوامل اکولوژیکی، *Medicago sativa*.

نویسنده مسئول: psalehi@rifr-ac.ir تلفن: ۰۲۱-۴۴۵۸۰۲۷۶

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

یونجه (*Medicago sativa* L.) از مهم‌ترین گیاهان علوفه‌ای بومی ایران است که در شرایط متنوع آب و هوایی می‌روید. یونجه علاوه بر این‌که علوفه‌ای با کیفیت بالا از مواد مغذی تولید می‌کند تأثیر مثبتی بر محیط خاک نیز می‌گذارد. یونجه گیاهی اتوتتراپلوئید (۳۲ = ۴x = ۲n) و دگرگشن بوده که به وسیله بذر تکثیر می‌شود. این ویژگی‌ها منجر به بروز پیچیدگی‌های ژنتیکی در درون و بین جمعیت‌های یونجه شده است. متداول‌ترین روش‌های اصلاح یونجه عبارت از اشکال مختلف گزینش توده‌ای، گزینش دوره‌ای فنوتیپی و تولید واریته‌های ترکیبی است. از آن‌جایی که اصلاح گیاهان بر پایه تنوع و گزینش بنا نهاده شده است، برای انجام یک برنامه به‌نژادی موفق و تولید ارقام زراعی جدید وجود اطلاعاتی درباره تنوع ژنتیکی ژرم‌پلاسم ضروری است. تنوع ژنتیکی حوزه فعالیت و انتخاب به‌نژادگر را برای گزینش و دیگر عملیات به‌نژادی افزایش می‌دهد. آگاهی از تنوع ژنتیکی گونه‌ها اهمیت زیادی دارد زیرا روش‌های کلاسیک اصلاح نباتات رفته رفته تنوع ژنتیکی را کاهش می‌دهند و این کاهش می‌تواند برای آینده برنامه‌های به‌نژادی خطرآفرین باشد (Tucak *et al.*, 2008).

تنوع و تمایز بین و درون جمعیتی به صورت سنتی به وسیله ویژگی‌های مورفولوژیکی و زراعی انجام می‌شود (Masoudi *et al.*, 2008؛ Ganji Moghaddam and Talaie, 2006). ولی ازآن‌جایی که این ویژگی‌ها تحت تاثیر عوامل محیطی بوده و در بسیاری مواقع تنوع مشاهده شده پلاستیسیتی است، مطالعه آن‌ها برآورد صحیحی را از میزان تنوع ژنتیکی به دست نخواهند داد. در حالی‌که عوامل محیطی نمی‌توانند بسیاری از نشانگرهای ملکولی و بیوشیمیایی را متاثر نمایند. لذا برآورد گوناگونی حاصل از این نشانگرها تنوع موجود در سطح ژن‌ها را نشان می‌دهد (Ghafoor and Arshad, 2008).

اگرچه امروزه نشانگرهای مولکولی متعددی برای برآورد تنوع ژنتیکی وجود دارد ولی الکتروفورز پروتئین‌ها همواره روشی مناسب و مرسوم برای برآورد تنوع ژنتیکی در گیاهان به شمار رفته است، زیرا علاوه بر هزینه پایین، برخلاف اغلب نشانگرهای مرتبط با DNA که نشانگرهای خنثی غیرژنی هستند، پروتئین‌ها فرآورده ژن‌ها بوده و از کارایی بالاتری برخوردار هستند (Manoosi *et al.*, 2010). الگوی پروتئینی بسیاری از گیاهان تا کنون با اهدافی مثل مطالعه تنوع ژنتیکی و شناسایی ارقام زراعی مطالعه شده است که می‌توان برای نمونه از مطالعاتی که روی *Ricinus communis* (Sathaiah and Reddy, 1985)، گونه‌های Capsicum (Panda *et al.*, 1986)، برنج (Aliaga-Morel *et al.*, 1987)، گونه‌های Arachis (Bianchi-Hal *et al.*, 1993)، ارقام پنبه (Naveed *et al.*, 2005)، *Pisum sativum*

Archive of SID

www.SID.ir

Avena fatua (Nisar *et al.*, 2006)، (Mirza *et al.*, 2007)، و ارقام گندم (Mohd *et al.*, 2007) انجام شده نام برد که عموماً حاکی از کاربرد بالای نشانگر پروتئینی در شناسایی گونه‌ها و ارقام مختلف یک گونه است. ولی نتایج بسیاری نیز وجود دارد که حاکی از عدم جداسازی ارقام مختلف توسط پروتئین‌های گیاه است (Javaid *et al.*, 2004؛ Alipour *et al.*, 2002؛ Sihag *et al.*, 2004؛ Malik *et al.*, 2009).

در مطالعات بسیاری که در دنیا انجام شده، گوناگونی ویژگی‌های مورفولوژیکی، سازگاری، اگرونومیکی، ایزوآنزیمی و الگو پراکنش جمعیت‌های وحشی یونجه به‌خوبی مطالعه و بررسی شده است (Jenczewski *et al.*, 1999؛ Ronfort *et al.*, 1998؛ Prosperi *et al.*, 2006). موفقیت‌های خوبی نیز در مطالعاتی که با استفاده از روش‌های مبتنی بر DNA شامل RAPD، ISSR، SRAP، SSR و AFLP در یونجه انجام شده به دست آمده است (Tucak *et al.*, 2008؛ Xavier *et al.*, 2011؛ Segovia-Lerma *et al.*, 2003). پژوهش‌های فوق حاکی از وجود تنوع و تمایز ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای در بین جمعیت‌های وحشی یونجه مطالعه شده است. در حالی که متأسفانه هیچ‌گونه اطلاعاتی در مورد تنوع ژنتیکی جمعیت‌های وحشی یونجه در ایران وجود ندارد و مطالعات انجام شده بر روی ارقام زراعی یونجه متمرکز بوده (Farshadfar *et al.*, 2008؛ Noeparvar *et al.*, 2008؛ Jafari and Goodarzi, 2007؛ Falahati Anbaran *et al.*, 2005؛ Fareghi *et al.*, 2006؛ Shariat, 2001؛ Darvishi Zeidabadi *et al.*, 2000؛ Koochaki and Vahbkhaki, 1985) که در طی فرایندهای اصلاح تغییرات قابل ملاحظه‌ای در ساختار ژنتیکی آن‌ها واقع شده است.

از آن‌جایی که فشار بر مراتع موجب فرسایش ژنتیکی شده و گرم شدن تدریجی زمین استفاده از انواع اصلاح شده گونه‌های مرتعی را ضروری می‌سازد، مطالعه ساختار ژنتیکی جمعیت‌های وحشی یونجه می‌تواند کمک شایانی به حفاظت، احیاء و توسعه این گونه با ارزش مرتعی کند. لذا هدف از این تحقیق ۱) شناسایی تنوع ژنتیکی و پلی‌مورفیسم درون گونه‌ای یونجه بر اساس پروتئین‌های کل، ۲) شناسایی عوامل اکولوژیکی مرتبط با تنوع ژنتیکی حاصل از الگوی پروتئین‌های کل و ۳) معرفی جمعیت‌هایی است که از تلاقی آن‌ها با ارقام زراعی می‌توان به بالاترین میزان هتروزیس رسید. در این پژوهش اطلاعات مفیدی در مورد زمینه ژنتیکی یونجه در اختیار قرار خواهد گرفت تا امکان ارائه برخی استراتژی‌های موثر برای حفاظت، اصلاح ژنتیکی و کاربرد پایدار از منابع ژرم پلاسم حاصل شود.

Archive of SID

www.SID.ir

مواد و روش‌ها

از بذر ۲۱ جمعیت وحشی ایرانی یونجه موجود در بانک ژن منابع طبیعی، موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، برای مطالعه پروتئین‌های کل استفاده شد.

در این تحقیق الکتروفورز پروتئین‌های کل به روش SDS-PAGE (الکتروفورز ژل پلی‌اکریل‌آمید دودسیل سولفات) انجام شد (Laemmli, 1970). بذر کلیه جمعیت‌های مورد مطالعه در شرایط استاندارد گلخانه در گلدان کشت شدند (در تابستان و پاییز سال ۱۳۸۹). از ۲۱۰ گیاه متعلق به ۲۱ جمعیت مورد مطالعه (هر جمعیت ۱۰ گیاه) مقدار یک گرم برگ جدا شد. نمونه‌ها به نسبت یک گرم برگ به ۱/۵ میلی‌لیتر از محلول استخراج (Tris-HCl یک مولار، pH=7.5، Na2EDTA یک مولار و ۲-مرکاپتواتانل ۰/۰۴٪) به خوبی در هاون سرد همگن شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس همگناها با دور xg ۱۱۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. محلول صاف شده رویی با محلول بافر نمونه (Tris-HCl نیم مولار، pH=6.8، SDS ۰/۲٪ و ۲-مرکاپتواتانل ۰/۵٪، گلیسرول ۱٪ و برموفنل بلو ۰/۰۲٪) به نسبت ۱:۱ مخلوط و به میکروتیوپ درب‌دار منتقل و در دستگاه بن‌ماری در درجه حرارت ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه جوشانده شد. نمونه‌ها تا زمان مصرف در فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

مقدار ۳۰ میکرولیتر از هر نمونه بر روی ژل سدیم دودسیل سولفات پلی اکریل آمید (Laemmli, 1970) بارگیری شد. ژل‌ها پس از انجام الکتروفورز به مدت ۳۰ دقیقه داخل محلول تثبیت (شامل ۲۰ گرم تری کلرو استیک اسید در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب) قرار گرفتند. سپس به مدت ۴ ساعت در محلول رنگ‌آمیزی (شامل کماسی بلو ۰/۲۵٪، متانول ۲۵٪ و اسید استیک ۱۰٪) رنگ‌آمیزی شدند. ژل‌ها تا ظاهرسازی باندهای پروتئین در محلول رنگ بر (شامل متانول ۲۵٪ و اسید استیک ۱۰٪) قرار گرفتند. دستگاه مولد برق با ولتاژ ۱۸۰ ولت و شدت جریان ۴۰ میلی آمپر تنظیم شد. زمان جداسازی پروتئین حدود ۵ ساعت و میزان حرکت عصاره در ژل ۱۰ سانتی‌متر بود. اطلاعات حاصل از پروتیین‌های کل به صورت باندهای مجزای پروتئینی برای هر گیاه روی ژل پلی‌اکریل آمید نمایان شد. برای تعیین وزن مولکولی باندهای پروتئینی از لدر با وزن‌های مولکولی ۲۹۰۰۰، ۴۵۰۰۰، ۱۳۲۰۰۰ و ۲۷۲۰۰۰ دالتون استفاده شد.

تجزیه داده‌ها

جایگاه هر یک از این باندها روی ژل از طریق حرکت نسبی آن‌ها مشخص و به صورت اعداد کمی بیان گردید. بر اساس وجود (عدد یک) یا عدم وجود هر باند (عدد صفر) در فواصل مختلف، نسبت به تشکیل ماتریس داده‌ها اقدام شد. فراوانی باندها، نسبت تعداد باندهای پلی‌مورف نسبت به تعداد کل باندها و

www.SID.ir

پلی‌مورفیسم باندها با نرم‌افزار NTSYS-pc (Rohlf, 2004) محاسبه شد. تسهیم گوناگونی ژنتیکی درون و بین گروهی توسط تجزیه واریانس ملکولی AMOVA (Excoffier *et al.*, 1992) و برنامه نرم‌افزاری ARLEQUIN 1.1 (Schnieder *et al.*, 1997) تعیین شد. اهمیت هر جزء واریانس با آزمون Permutation (Excoffier *et al.*, 1992) مطالعه شد. فاصله ژنتیکی میان جمعیت‌ها بر اساس معادله Nei (Nei, 1978) برآورد شد. از آزمون Neighbor-Joining با نرم‌افزار MEGA (Tamura *et al.*, 2007) و روش تجزیه به بردارهای اصلی (Gower, 1966) برای تفسیر ماتریس فاصله ژنتیکی استفاده شد. برای بررسی رابطه بین عوامل ژنتیکی و اکولوژیکی و محیطی که شامل میانگین کل و ماهانه ده ساله بارندگی (در واحد میلی‌متر)، میانگین بیشینه و کمینه ده ساله دما (در واحد درجه سانتی‌گراد) و ارتفاع از سطح دریا (در واحد متر) است از نرم‌افزار SPSS و ضریب همبستگی پیرسون استفاده شد. همچنین برای بررسی همبستگی ماتریس‌های فاصله‌های پروتئین‌های کل جمعیت‌های بذری و فاصله‌های جغرافیایی آن‌ها (فاصله بر حسب کیلومتر منشاء جمع‌آوری جمعیت‌های بذری) از آزمون مانتل (Mantel, 1967) نیز استفاده شد.

نتایج و بحث

جدول ۱ منشاء و مشخصات جمعیت‌های یونجه و جدول ۲ ویژگی‌های آب و هوائی مناطق جمع‌آوری آن‌ها را نشان می‌دهد.

الگوی الکتروفورز پروتئین‌های کل یونجه درمیان ۲۱ جمعیت مورد مطالعه در کل، ۴۴ باند را نشان داد. وزن ملکولی باندها از ۶۶۰۶ تا ۲۶۹۱۵۳ دالتون متغیر بود (شکل ۱). دو جمعیت ارومیه۳ و مسجد سلیمان با ۴۲ باند بیشترین تعداد باندها و دو جمعیت تبریز۱ و کردستان با ۳۴ باند کمترین تعداد باندها را داشتند (جدول ۳). هیچ باند نادری در میان جمعیت‌های مختلف مشاهده نشد. میانگین درصد چندشکلی ۲۵/۴۳٪ بود که کمترین درصد آن مربوط به جمعیت‌های کرج ۱ و ارومیه۲ با ۶/۸۲٪ و بیشترین درصد چندشکلی مربوط به جمعیت‌های مراغه و اهر با ۴۰/۹۱٪ بود. میانگین تعداد باندهای چندشکل نسبت به کل باندها در کلیه جمعیت‌ها از ۰/۰۳۰ تا ۰/۱۷۲ متغیر و به ترتیب مربوط به کرج ۱ و اهر بود (جدول ۳).

نتایج این پژوهش حاکی از وجود تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای در بین جمعیت‌های مختلف یونجه است. چنین مقادیری از گوناگونی در پروتئین‌های گیاه، قابل مقایسه با نتایج پروسپری (Prosperi *et al.*, 2006) است که تنوع ژنتیکی ۱۰۳ جمعیت طبیعی از یونجه را در اسپانیا مطالعه کرده است. او با بررسی تنوع ژنتیکی و مورفولوژیکی منابع ژنتیکی وحشی *M. sativa* (که به ویژه از کنار جاده‌ها

Archive of SID

www.SID.ir

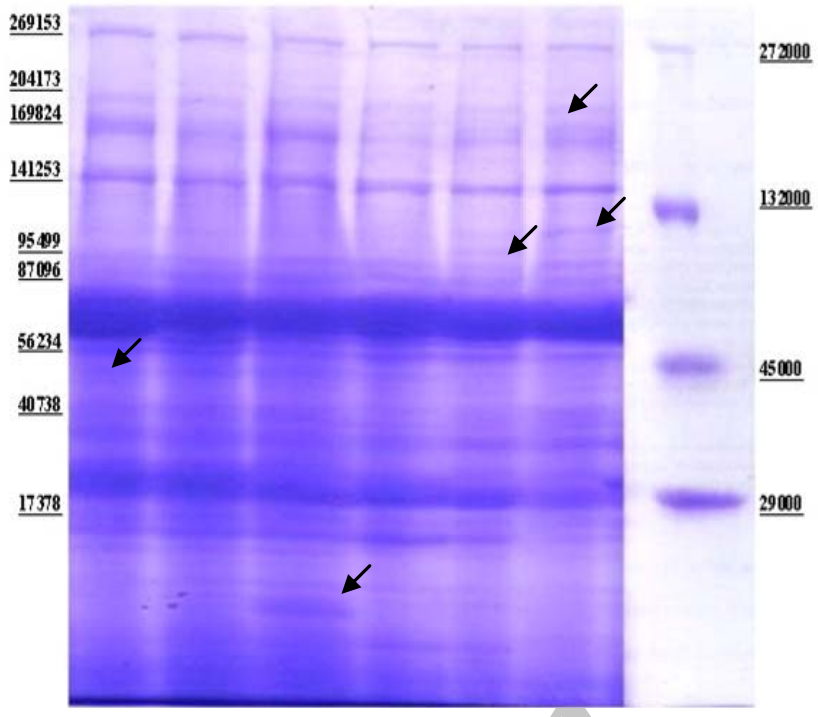
جدول ۱- ویژگی‌های مکانی جمعیت‌های یونجه مورد مطالعه
Table 1. Location characteristics of *M. sativa* populations

Origin	محل جمع‌آوری	کد بانک ژن Gene bank code	Code	نام اختصاری	طول جغرافیایی Longitude	عرض جغرافیایی Latitude	ارتفاع از سطح دریا Altitude (m)
Karaj	کرج	137	Karaj 1	کرج۱	51°-۰۰'	35°-49'	1360
Karaj	کرج	1003	Karaj 2	کرج۲	51°-۰۰'	35°-49'	1360
Urumie	ارومیه	1363	Urumie 1	ارومیه۱	45°-۰2'	32°_37'	1322
Urumie	ارومیه	1375	Urumie 2	ارومیه۲	45°-۰2'	32°_37'	1322
Urumie	ارومیه	1756	Urumie 3	ارومیه۳	45°-۰2'	32°_37'	1322
Ardebil	اردبیل	1001	Ardebil 1	اردبیل۱	48°-18'	38°-15'	1311
Ardebil	اردبیل	20252	Ardebil 2	اردبیل۲	48°-18'	38°-15'	1311
Hamedani	همدانی	1004	Hamedan	همدان	48°-31'	34°-48'	1850
Shiraz	شیراز	2111	Shiraz	شیراز	52°-05'	28°-52'	797
Khoramabad	خرم‌آباد	3001	Khoramabad	خرم‌آباد	48°-21'	33°-29'	1200
Tabriz	تبریز	20246	Tabriz 1	تبریز۱	46°-17'	38°-05'	1366
Tabriz	تبریز	20362	Tabriz 2	تبریز۲	46°-17'	38°-05'	1366
Maragheh	مراغه	20248	Maragheh	مراغه	46°-16'	37°-23'	1450
Ahar	اهر	20253	Ahar	اهر	47°-06'	38°-28'	1341
Masjedsoleyman	مسجدسلیمان	20285	Masjedsoleiman	مسجدسلیمان	49°-18'	'56-31°	320.5
Arak	اراک	20312	Arak 1	اراک۱	49°-42'	34°-05'	1755
Arak	اراک	20314	Arak 2	اراک۲	49°-42'	34°-05'	1755
Bam	بم	20319	Bam	بم	58°-21'	29°-06'	1060
Kordestan	کردستان	20320	Kordestan	کردستان	47°-00'	35°-19'	1480
Nikshahr	نیک‌شهر	20321	Nikshahr	نیک‌شهر	60°-12'	26°-13'	450
Ghoochan	قوچان	20330	Ghoochan	قوچان	58°-30'	37°-06'	1340

و زمین‌های مخصوص چرا و آبیاری شده جمع‌آوری شده بودند)، اختلاف مهمی بین جمعیت‌های وحشی و زراعی مشاهده کرد. اما به دلیل وجود جریان ژن بین جمعیت‌های وحشی و ارقام زراعی، شباهت زیادی در جمعیت‌ها پیدا کرد. براساس یافته‌های گاردینر و فورد (Gardiner and Forde, 1988) اختلاف موجود در فراوانی باندها در افراد و به تبع آن در جمعیت‌های مختلف ناشی از تفاوت در تعداد ژن‌های کد کننده پروتئین‌های گیاه است.

مطالعه تسهیم گوناگونی ژنتیکی درون و بین جمعیتی ۲۱ جمعیت یونجه مورد مطالعه، سطح نسبتاً بالایی از گوناگونی ژنتیکی را در درون جمعیت‌ها (۶۴٪) برآورد کرد در حالی که ۳۶٪ گوناگونی کل در بین جمعیت‌ها قرار داشت (جدول ۴). بنابراین بیشترین تنوع ژنتیکی در درون جمعیت‌ها است و با نتایجی که از سایر نشانگرهای مولکولی به دست آمده است نیز همخوانی دارد (Mengoni *et al.*, 2000 a, b). مهم‌ترین دلیل تنوع ژنتیکی زیاد در داخل

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۱- تصویری از ژل اکریل آمید ۶ گیاه یونجه خرم‌آباد به همراه نشانگر تعیین وزن مولکولی (بر حسب دالتون)

Fig. 1. SDS-PAGE image of six Khoramabad genotypes of *Medicago sativa* with size molecular weight (Dalton)

جمعیت‌های یونجه دگرگشنی وتتراپلوئیدی بودن این گیاه است (Ronfort *et al*, 1998). چنین درصد تنوع درون جمعیتی زیاد و بین جمعیتی کم با نتایج منگونی و همکاران (Mengoni *et al.*, 2000b) که با استفاده از ۳ جایگاه ریزماهواره هسته‌ای به دست آمده است مطابقت دارد. در حالی که مقادیر به دست آمده در پژوهش حاضر تفاوت بسیاری با نتایج فلاحتی عنبران و همکاران (Falahati Anbaran *et al.*, 2005) دارد. آن‌ها تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیتی یونجه‌های زراعی (*M. sativa*) از مناطق یزد، کرمان، اصفهان، خراسان، لرستان و همدان را با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره مطالعه و به این نتیجه رسیدند که اگرچه تنوع معنی‌داری در بین جمعیت‌ها در سطح احتمال ۵٪ مشاهده شد ولی تنها ۲٪ از تنوع کل به علت تنوع و تمایز بین جمعیت‌ها بود در حالیکه ۹۸٪ تنوع کل به تفاوت بین ژنوتیپ‌های داخل جمعیت‌ها برمی‌گشت. چنین اختلافی بین نتایج این تحقیق و گزارش یاد شده به علت وحشی بودن نمونه ها در پژوهش حاضر و زراعی بودن در آن آزمایش است (Falahati Anbaran *et al.*, 2005).

www.SID.ir

جدول ۲- ویژگی‌های آب و هوایی مناطق جمع‌آوری ۲۱ جمعیت یونجه (در سال‌های ۱۳۸۶-۱۳۷۷)
Table 2. Climatical characteristics of 21 *Medicago sativa* populations (during 1998-2007)

Location	محل	Minimum temperature (ºC) میانگین کمینه دما	Maximum temperature (ºC) میانگین بیشینه دما	Monthly precipitation mean (mm) میانگین ماهانه بارندگی	Total precipitation mean (mm) میانگین کل بارندگی
Urumie	ارومیه	5.63	18.40	21.747	260.28
Tabriz	تبریز	8.11	19.29	20.311	243.77
Maragheh	مراغه	8.35	19.32	21.862	262.36
Ahar	اهر	5.59	17.03	23.327	279.67
Ardebil	اردبیل	3.35	16.04	22.491	269.95
Kordestan	کردستان	6.64	22.50	22.763	368.20
Hamedan	همدان	4.30	19.81	36.085	313.08
Karaj	کرج	9.38	21.78	22.535	270.97
Arak	اراک	7.65	21.31	26.132	313.33
Khoramabad	خرم‌آباد	9.17	25.45	38.164	458.02
Masjedsoleyman	مسجدسلیمان	19.37	31.99	34.221	409.51
Shiraz	شیراز	11.19	26.43	27.932	335.25
Bam	بم	18.20	30.21	3.663	44.01
Nikshahr	نیک شهر	20.31	34.68	5.926	71.17
Ghoochan	قوچان	6.73	19.78	28.115	337.44

برای تشریح الگوی تمایز، فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها براساس برآورد Unbiased فاصله ژنتیکی Nei (Nei, 1978) در جمعیت‌های مناطق مختلف محاسبه شد. مقدار فاصله ژنتیکی از ۰/۰۱۲ بین جمعیت‌های ارومیه ۱ و ارومیه۲ تا ۰/۲۱۸ بین جمعیت‌های اهر وکرج۱ و ۰/۲۴۱ بین جمعیت‌های اهر و خرم آباد با میانگین ۰/۰۷۰ بود (جدول ۵). از فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها برای تجزیه به بردارهای اصلی(PCoA) استفاده شد. با توجه به این‌که که حدود ۷۳/۶۹ درصد گوناگونی در میان سه بردار اصلی قرار داشت، بنابراین این سه بردار به عنوان بردارهای اصلی در نظر گرفته شد. بردار اصلی اول و دوم به ترتیب ۴۰/۱۱ و ۲۱/۷۲ درصد از گوناگونی کل را به خود اختصاص دادند. بردار اصلی اول جمعیت‌های اراک ۱، قوچان، کرج ۲، نیک‌شهر، اهر، کردستان، همدان، بم، تبریز ۱، مراغه را از سایر جمعیت‌ها جدا کرد. همان گونه که مشاهده می‌شود هیچ ساختار جغرافیایی در این تمایز وجود نداشت (شکل ۲)، به طوری که جمعیت‌های دور از هم مثل بم و همدان در یک گروه قرار گرفتند. برای تشریح الگوی تمایز از فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها ازروش Neighbor-Joining نیز

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۳- برخی پارامترهای تنوع ژنتیکی (فراوانی باندهای پروتئین) ۲۱ جمعیت ایرانی یونجه
Table 3. Some genetic diversity characteristics of 21 Iranian populations of *Medicago sativa*

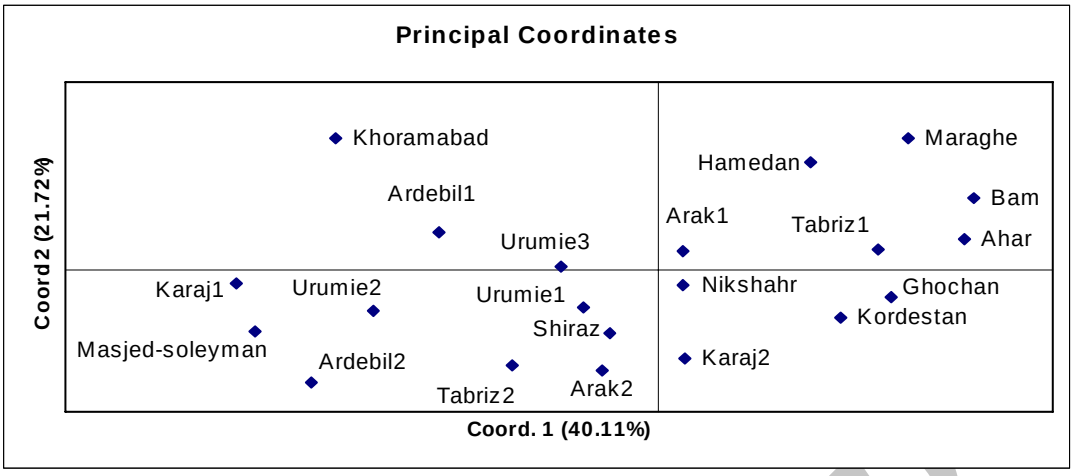
Population	جمعیت	تعداد باندها No. bands	درصد پلی‌مورفیسم Polymorphism %	تعداد باندهای پلی‌مورف نسبت به کل باندها Mean polimorphic bands over the total bands	باندهایی با فراوانی ≤۵۰٪ No.common bands ≤50%	باندهایی با فراوانی≤۲۵٪ No. common bands ≤25%	باندها یی با فراوانی≤۵٪ No. bands ≥5%
Urumie 1	ارومیه۱	36	13.64	0.058	1	0	36
Urumie 2	ارومیه۲	35	6.82	0.032	0	0	35
Urumie 3	ارومیه۳	42	34.09	0.109	6	3	42
Tabriz 1	تبریز۱	34	25.00	0.093	0	0	34
Tabriz 2	تبریز۲	38	34.64	0.051	2	1	38
Maragheh	مراغه	40	40.91	0.123	4	2	40
Ahar	اهر	34	40.91	0.172	0	0	34
Ardebil 1	اردبیل۱	38	18.18	0.069	2	0	38
Ardebil 2	اردبیل۲	40	27.27	0.102	4	0	40
Kordestan	کردستان	34	27.27	0.115	0	0	34
Hamedan	همدان	35	22.73	0.089	2	1	35
Karaj 1	کرج۱	39	6.82	0.030	3	1	39
Karaj 2	کرج۲	37	29.55	0.127	3	1	37
Arak 1	اراک۱	37	36.36	0.149	1	0	37
Arak 2	اراک۲	38	22.73	0.086	3	1	38
Khoramabad	خرم‌آباد	38	22.73	0.092	5	2	38
Masjedsoleyman	مسجدسلیمان	42	22.73٪	0.074	6	2	42
Shiraz	شیراز	38	34.09	0.138	2	0	38
Bam	بم	35	25.00	0.074	1	0	35
Nikshahr	نیک‌شهر	41	31.82	0.100	6	2	41
Ghoochan	قوچان	38	31.82	0.115	3	1	38

جدول ۴- AMOVA داده‌های پروتئین‌های کل ۲۱ جمعیت ایرانی یونجه
Table 4. Analysis of molecular variance of 21 Iranian populations of *Medicago sativa* using protein data

Source	منبع	درجه آزادی df.	میانگین مربعات Mean square	درصد واریانس Variance (%)	احتمال Probability
Among populations	میان جمعیت‌ها	20	12.500	36	
Within populations	درون جمعیت‌ها	158	2.170	64	0.010
Total	کل	178	14.671		

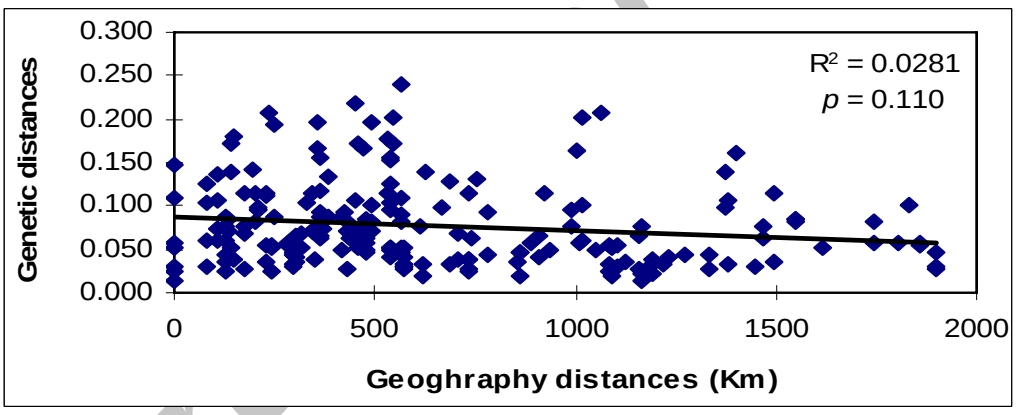
استفاده شد (Tamura *et al.*, 2007). در دندروگرام NJ، کلیه جمعیت‌های مورد بررسی به دو کلاستر عمده تقسیم شدند (شکل ۳). در این دندروگرام جمعیت‌های خرم‌آباد و اردبیل۱

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۲- نمودار حاصل دو بردار اصلی اول (PCoA) برای ویژگی‌های ژنتیکی پروتئین‌های کل ۲۱ جمعیت ایرانی یونجه بر اساس فاصله ژنتیکی نااریب Nei

Fig. 2. Two-dimensional graph based on the ordination scores of the principal coordinate analysis (PCoA) using Nei's unbiased genetic distances



شکل ۳- پراکندگی همبستگی بین ماتریس‌های فاصله ژنتیکی پروتئین‌های کل جمعیت‌های مختلف ایرانی یونجه و فاصله جغرافیایی

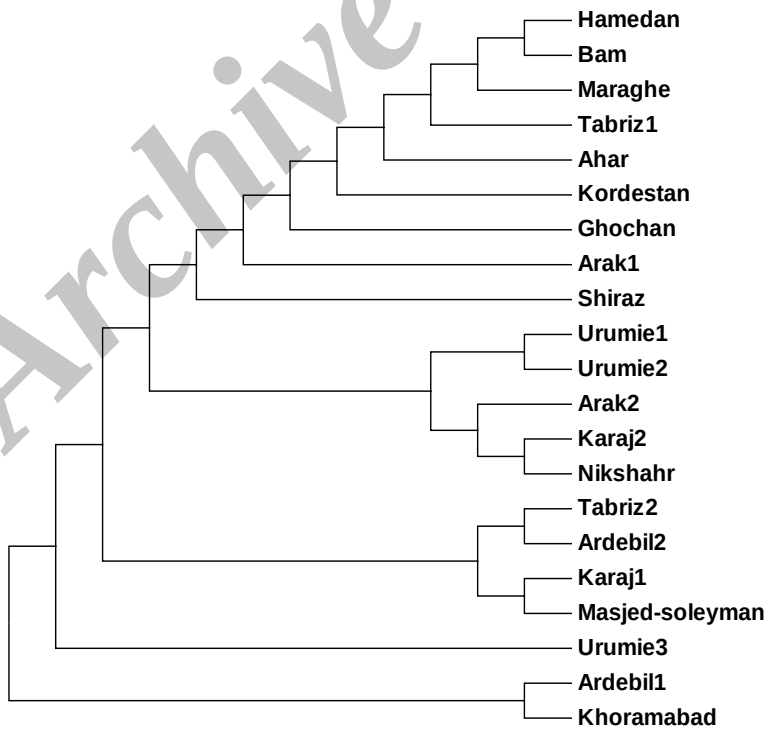
Fig.3. Scatter plot of pair-wise total protein and geographic distances of Iranian populations of *Medicago sativa*

در یک کلاستر و سایر جمعیت‌ها در کلاستر دیگر قرار گرفتند. فاصله ژنتیکی مشاهده شده در کلاستر فوق شباهت بسیاری با گروه‌بندی جمعیت‌ها توسط آزمون PCoA داشت. همان‌گونه که مشاهده می‌شود خرم‌آباد و اردبیل۱ توسط دو بردار ۱ و ۲ از سایر جمعیت‌ها جدا شده‌اند. البته جمعیت ارومیه۳ بر روی بردار ۲ در فاصله نزدیکی با اردبیل۱ قرار گرفته که چنین نزدیکی در کلاستر NJ نیز قابل مشاهده است.

www.SID.ir

نتیجه تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) (جدول ۴) نیز سطح نسبتاً بالایی از گوناگونی ژنتیکی را در درون جمعیت‌ها (۶۴٪) نشان داد و فقط (۳۶٪) از گوناگونی، میان جمعیت‌های مختلف قرار داشت. علی‌رغم تنوع ژنتیکی زیاد در بین جمعیت‌های مورد مطالعه یونجه، اختصاص الگوی پروتئینی خاصی به هر یک از جمعیت‌ها و یا برخی جمعیت‌ها امکان‌پذیر نشد. این موضوع می‌تواند ناشی از پدیده جریان ژن در بین جمعیت‌های وحشی و نیز بین جمعیت‌های وحشی و ارقام زراعی حاصل شده باشد (Prosperi *et al.*, 2006؛ Falahati Anbaran *et al.*, 2005).

ضرایب همبستگی جفت ماتریس‌های فاصله ژنتیکی و جغرافیایی جمعیت‌های یونجه با استفاده از آزمون مانتل محاسبه شد. همبستگی بین ماتریس‌های فاصله‌های پروتئین‌های کل و جغرافیایی مناطق مختلف بسیار کم بود (شکل ۴) که از نظر آماری نیز معنی دار نبود (R=۰/۰۲۸، P=۰/۱). تجزیه و تحلیل رابطه پیرسون نشان داد که بین هفت شاخص پارامترهای تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مختلف و عوامل اقلیمی (شامل میانگین بارندگی کل، میانگین ماهانه بارندگی، میانگین بیشینه دما، میانگین کمینه دما) اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (جدول ۶) و فقط بین ارتفاع از سطح



شکل ۴- دندروگرام ۲۱ جمعیت ایرانی یونجه حاصل با روش تجزیه کلاستر Neighbour-joining
Fig. 4. Dendrogram of 21 Iranian populations of *Medicago sativa* produced by the neighbour-joining clustering method

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۵- ماتریس برآورد نااریب فاصله‌های ژنتیکی ۲۱ جمعیت ایرانی یونجه

Table 5. Pairwise values for Nei's genetic distances of 21 Iranian populations of *Medicago sativa*

Population	جمعیت	ارومیه ۱ Urumie 2	ارومیه ۲ Urumie 2	ارومیه ۳ Urumie 3	تبریز ۱ Tabriz 1	تبریز ۲ Tabriz 2	مراغه Maraghe	اهر Ahar	اردبیل ۱ Ardebil 1	اردبیل ۲ Ardebil 2	کردستان Kordestan	همدان Hamedan	کرج ۱ Karaj 1	کرج ۲ Karaj 2	اراک ۱ Arak 1	اراک ۲ Arak 2	خرم‌آباد Khoramabad	مسجدسلیمان Masjed Soleyman	شیراز Shiraz	بم Bam	نیک‌شهر Nikshahr	قوچان Ghoochan
Urumie 1	ارومیه ۱	0.000																				
Urumie 2	ارومیه ۲	0.012	0.000																			
Urumie 3	ارومیه ۳	0.030	0.025	0.000																		
Tabriz 1	تبریز ۱	0.088	0.076	0.060	0.000																	
Tabriz 2	تبریز ۲	0.037	0.024	0.044	0.109	0.000																
Maraghe	مراغه	0.074	0.074	0.061	0.030	0.104	0.000															
Ahar	اهر	0.096	0.098	0.096	0.060	0.127	0.052	0.000														
Ardebil 1	اردبیل ۱	0.044	0.056	0.030	0.115	0.067	0.115	0.137	0.000													
Ardebil 2	اردبیل ۲	0.048	0.044	0.033	0.078	0.028	0.083	0.106	0.058	0.000												
Kordestan	کردستان	0.041	0.035	0.067	0.053	0.070	0.055	0.073	0.114	0.071	0.000											
Hamedan	همدان	0.068	0.063	0.078	0.050	0.087	0.037	0.094	0.135	0.087	0.037	0.000										
Karaj 1	کرج ۱	0.110	0.090	0.083	0.197	0.101	0.172	0.218	0.117	0.093	0.156	0.194	0.000									
Karaj 2	کرج ۲	0.051	0.046	0.047	0.081	0.071	0.070	0.106	0.087	0.063	0.066	0.087	0.146	0.000								
Arak 1	اراک ۱	0.041	0.030	0.028	0.051	0.051	0.046	0.042	0.056	0.048	0.054	0.070	0.111	0.056	0.000							
Arak 2	اراک ۲	0.033	0.029	0.051	0.097	0.050	0.075	0.103	0.084	0.064	0.056	0.085	0.113	0.036	0.052	0.000						
Khoramabad	خرم‌آباد	0.153	0.156	0.124	0.202	0.173	0.166	0.241	0.116	0.177	0.208	0.181	0.166	0.197	0.140	0.172	0.000					
Masjed Soleyman	مسجدسلیمان	0.037	0.025	0.038	0.115	0.028	0.097	0.132	0.067	0.039	0.071	0.104	0.050	0.062	0.052	0.025	0.141	0.000				
Shiraz	شیراز	0.023	0.015	0.021	0.066	0.028	0.051	0.076	0.054	0.031	0.046	0.062	0.091	0.044	0.018	0.033	0.140	0.028	0.000			
Bam	بم	0.084	0.080	0.084	0.035	0.115	0.031	0.077	0.138	0.099	0.043	0.035	0.201	0.102	0.076	0.095	0.206	0.116	0.077	0.000		
Nikshahr	نیک‌شهر	0.047	0.031	0.027	0.055	0.056	0.056	0.100	0.081	0.057	0.053	0.063	0.106	0.032	0.043	0.029	0.162	0.042	0.037	0.073	0.000	
Ghoochan	قوچان	0.038	0.032	0.023	0.032	0.056	0.025	0.057	0.067	0.040	0.048	0.049	0.128	0.032	0.020	0.048	0.164	0.059	0.019	0.056	0.033	0.000

Archived in SID

www.SID.ir

دریا و تعداد باندها و تعداد باندهایی که بیشتر یا مساوی ۵٪ فراوانی داشتند همبستگی متوسط منفی و معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ وجود داشت.

جدول ۶- ضرایب همبستگی پیرسون بین فاکتورهای اکولوژیکی و صفات ژنتیکی پروتئین‌های کل
Table 6. Pearson correlation coefficients between ecological factors and total proteins parameters

Source منبع	دریا ارتفاع از سطح Altitude (m)	میانگین کمینه دما Minimum temperature (ºC)	میانگین بیشینه دما Maximum temperature (ºC)	میانگین ماهانه بارندگی Mean of monthly precipitation (mm)	میانگین کل بارندگی Mean of total precipitation (mm)
تعداد باندها No. bands	-0.473*	0.322ns	0.288ns	0.056ns	0.046ns
میانگین تعداد باند با فراوانی ≤۵٪ No. bands Freq≥5%	-0.473*	0.322ns	0.288ns	0.056ns	0.046ns
میانگین تعداد باند با فراوانی ≥۲۵٪ No. common bands ≤25%	-0.061ns	0.090ns	0.185ns	-0.057ns	-0.060ns
میانگین تعداد باند با فراوانی ≥۵۰٪ No. common bands ≤50%	-0.426ns	0.345ns	0.364ns	0.144ns	0.136ns
تعداد باندهای پلی‌مورف نسبت به کل باندها Mean polymorphic bands over the total bands	0.077ns	-0.069ns	-0.025ns	0.154ns	0.157ns
درصد پلی‌مورفیسم Polymorphism %	-0.047ns	0.092ns	0.095ns	-0.006ns	-0.005ns

ns و * : به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی دار درسطوح احتمال ۵٪.

ns and * : Not-significant and significant at 5% level of probability, respectively.

عدم وجود ارتباط بین تنوع ژنتیکی و توزیع جغرافیایی در گیاهان مختلفی گزارش شده است (Alipour *et al.*, 2002؛ Javaid *et al.*, 2004؛ Sihag *et al.*, 2004؛ Malik *et al.*, 2009). تاکنون مطالعات بسیاری انجام شده تا مارکرهای مناسبی برای گیاهان مختلف شناسایی شود که تحت تأثیر عوامل محیطی نباشند. با توجه به این واقعیت که در مطالعه حاضر و بسیاری از گیاهان، گوناگونی پروتئین‌های کل ارتباطی با توزیع جغرافیایی و عوامل اکولوژیکی نشان نمی‌دهند، این مارکر می‌تواند ابزار مفیدی برای شناسایی جمعیت‌هایی که دارای تنوع ژنتیکی بالایی هستند باشد تا از آن‌ها در برنامه‌های حفاظت و اصلاح استفاده شود. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که علی‌رغم برداشت بی‌رویه از مراتع، جمعیت‌های مختلف یونجه از تنوع قابل ملاحظه‌ای برخوردارند که می‌بایست در هر دو برنامه‌های حفاظتی *In situ* و *Ex situ*، حفاظت از جمعیت‌های وحشی یونجه مورد توجه قرار گیرد. از آن‌جایی‌که وجود تنوع ژنتیکی یکی از شرایط ضروری برای موفقیت برنامه‌های

Archive of SID

www.SID.ir

به‌نژادی است، می‌توان از جمعیت‌هایی که از تنوع و تمایز زنتیکی بالایی برخوردار هستند در دورگ‌گیری با ارقام زراعی استفاده کرد تا از خطر فرسودگی و انحطاط ناشی از خویش‌آمیزی جلوگیری به عمل آید. با توجه به این‌که در این پژوهش کمترین درصد پلی‌مورفیسم مربوط به جمعیت‌های کرج۱ و ارومیه۲ با ۶/۸۲٪ و بیشترین درصد پلی‌مورفیسم مربوط به جمعیت‌های مراغه و اهر با ۴۰/۹۱٪ بود. این جمعیت‌ها و نیز جمعیت‌های اهر- کرج۱ و اهر – خرم‌آباد که بیشترین فاصله ژنتیکی با یک‌دیگر را داشتند برای ایجاد تنوع ژنتیکی و آزمایش‌های تلاقی در پروژه‌های به‌نژادی پیشنهاد می شوند.

سپاسگزاری

پژوهش حاضر بخشی از نتایج طرح تحقیقاتی مصوب موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور با عنوان بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های گونه‌های *Dactylis glomerata*، *Medicago sativa*، *Agropyron cristatum* و *Agropyron deserterum* توسط پروتئین‌های کل است. بدین وسیله از کلیه کسانی که ما را به نحوی در انجام این پژوهش یاری دادند سپاسگزاری می‌شود.

References

Aliaga-Morel, J. R., Culianez-Marcia, F. A., Clemente-Marin, G., and Primo-Yufera, E. 1987. Differentiation of rice cultivars by electrophoresis of embryo protein. Theoretical and Applied Genetics 74: 224-232.

Alipour, H., Rezai, A., Meibodi, S. A. M., and Taheri, M. 2002. Evaluation of genetic variation in soybean lines using seed protein electrophoresis. Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources 5: 85-96.

Bianchi-hall, C. M., Keys, R. D., Stalker, H. T., and Murphy, J. P. 1993. Diversity of seed storage protein patterns in wild peanut (Arachis, Fabaceae) species. Plant Systematic and Evolution 186: 1-15

Darvishi Zeidabadi , D., Mirzaei Nadooshan, H., Hesamzade Hejazi, M., and Madah Arefi, H. 2000. Variation study between several *Medicago sativa* by electrophoresis seed storing proteins. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research 9: 111-124 (in Persian).

Excoffier, L., Smouse, P., and Quattro, J. 1992. Analysis of molecular variances among DNA restricion data. Genetics 131: 479-491.

Archive of SID

www.SID.ir

Falahati Anbaran, M., Habashi, A. A., Esfehani, M., Mohammadi, S. A., and Gharehyazi, B. 2005. Structure and genetic diversity among and whitin Iranian alfalfa populations using microsatellites markers. Iranian Journal of Agricultural Science 36(4): 979-989 (in Persian).

Fareghi, Sh., Farshadfar, M., and Farshadfar, A. 2007. Assessment some *Medicago sativa* based on chemical ingredient, food combinations and genetic diversity by SDS-PAGE marker. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research 15: 120-196 (in Persian).

Farshadfar, M., Freghi, Sh., Farshadfar, A., and Jafari, A. A. 2008. Genetic diversity of *Medicago sativa* using morphology and chemical characteristics. Iranian Journal of Rangelands Forests Plant Breeding and Genetic Rresearch 16: 1-13 (in Persian).

Ganji Moghaddam E., and Talaie, A. 2006. Investigation on genetic diversity in mahaleb(*Prunus mahaleb* L.) populations using morphological characters. Seed and Plant 22: 29-41 (in Persian).

Gardiner, S. E., and Forde, M. B. 1988. Identification of cultivars and species of pasture legumes by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel genetic diversity in Black gram (*Vigna mungo* L. Hepper). Field Crops Research 69: 183–190.

Ghafoor, A., and Arshad, M. 2008. Seed protein profiling of *Pisum sativum* (L.) germplasm using sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) for investigation of biodiversity. Pakistan Journal of Botany 40: 2315-2321.

Gower, J. G. 1966. Some distance properties of latent root and rector methods used in multivariate analysis. Biometrika 53: 325-338.

Jafari, A., and Goodarzi, A. 2007. Genetic variation for yield and its relationship with quality and agronomic traits in 72 accessions of alfalfa (*Medicago sativa* L.). Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research 15: 229-239 (in Persian).

Javaid, A., Ghafoor, A., and Anwar, R. 2004. Seed storage protein electrophoresis in groundnut for evaluating genetic diversity. Pakistan Journal of Botany 30(1): 25-29.

Archive of SID

www.SID.ir

Jenczewski, E., Prosperi, J. M., and Ronfort, J. 1999. 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.

Koochaki, A., and Vahbkhaki, T. 1985. Comparison agricaultural and morphological traits between 12 alfalfa in Mashhad climatical condition. Iranian Journal of Agricultural Sciences 18(1,2): 1-5 (in Persian).

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.

Malik, M. F. A., Qureshi, A. S., Ashraf, M., Khan, M. R., and Javed, A. 2009. Evaluation of genetic diversity in soybean (*Glycine max*) lines using seed protein electrophoresis. Australian Journal of Crop Science 3(2): 107-112.

Manoosi, H., Valizadeh, M., Zahtab Salmasi, S., Aharizad, S., and Solooki, M. 2010. Genetic variation in native cultivars and centetic alfalfa using seed storage proteins. Iranian Journal of Field Crop Science 41(1): 121-113 (in Persian).

Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Research 27: 209-220.

Masoudi, B., Bihamta, M. R., Babaei, H. R., and Peyghambari, S. A. 2008. Evaluation of genetic diversity for agronomic, morphological and phenological traits in soybean. Seed and Plant 24:413-427 (in Persian).

Mengoni, A., Gori, A., and Bazzicalupo, M. 2000a. Use of RAPD and microsattellite (SSR) variation to assess genetic relationsgips among populations of tetraploid alfalfa, *Medicago sativa*. Plant Breeding 119: 311- 317.

Mengoni, A., Ruggini, C., Vendramin, G.G., and Bazzicalupo, M. 2000b. Chloroplast microsatellite variations in tetraploid alfalfa. Plant Breeding 119: 509-512.

Mirza, B., Shoaib, M., Ahmad, M., and Fu, Y.B. 2007. Genetic diversity in Pakistani populations of *Avena fatua* revealed by seed storage protein polymorphism. Crop Sience 2: 41-48.

Mohd, S., Alam, Z., Zahir, A., Weqar, A., Taufiq, A., and Ikhtir, K. 2007. Characterization of wheat varieties by seed strong protein electrophoresis. African Journal of Biotechnology 6: 497-500.

Archive of SID

www.SID.ir

Naveed, M., Motomitsu, K., and Ghulam, M.A. 2005. Genetic differentiation of cotton cultivars by polyacrylamide gel electrophoresis. Centeral European Agriculture 6: 69-76.

Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics 89: 583-590.

Nisar, M., Ghafoor, A., Rashid Khan, M., and Sharif Qureshi, A. 2006. Screening of *Pisum Sativum* L. germplasm against *Erysiphe pisi* Syd. ACTA Biologica Cracoviensia Series Botanica 48: 33-37.

Noeparvar, S., Valizadeh, M., Monirifar, H., Haghighi, A. R., and Darbani, B. 2008. Genetic diversity among and within alfalfa populations native to Azerbaijan based on RAPD analysis. Journal of Biological Research 10: 159-169.

Panda, R. C., Kumar, O. A., and Rao, K. G. R. 1986. The use of seed protein electrophoresis in the study of phylogenetic relationship in chile pepper (*Capsicum* L.). Theoretical and Applied Genetics 7: 665-670.

Prosperi, J. M., Jenczewski, E., Angevain, M., and Ronfort, J. 2006. Morphologic and agronomic diversity of wild genetic resaurces of *Medicago sativa* L. collected in Spain. Genetic Resources and Crop Evolution 53: 843-856.

Rohlf, J. F. 2004. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system. version 2.11. Exeter, Setauket, NY.

Ronfort, J., Jenczwski, E., Bataillon, T., and Rosset, F. 1998. Analysis of population structure in autotetraploid species. Genetics 150: 921-930.

Sathaiah, V., and Reddy, T. P. 1985. Seed protein profile of caster (*Ricinus communis* L.) and some Jatropa species. Genetics in Agriculture 39: 35-43.

Schneider, S., Kuffer, J., Roessli, D., and Excoffier, L. 1997. Arlequin ver.1.1: software for population genetic data analysis, Genetic and Biometry Laboratory, University of Geneva.

Segovia-Lerma, A., Cantrellr, G., Conway, J. M., and Ray, I. M. 2003. AFLP-based assessment of genetic diversity among nine alfalfa germplasms using bulk DNA templates. Genome 46: 51–58.

Shariat, A., Mirzaei Nadooshan, H., Ghamari Zare, A., and Sangtarash, M. H. 2001. Electhrophoresis studing of storing proteins in yearlong *Medicago sativa*.

Archive of SID

www.SID.ir

Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research 9: 67-80 (in Persian).

Sihag, R., Hooda, J. S., Vashishtha, R. D., and Malik, B. P. S. 2004. Genetic divergence in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. Annals of Biology 20(1): 17-21.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S. 2007. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution 24: 1596-1599.

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.

Xavier, J. R., Kumar, J., and Srivastava, R. B. 2011. Characterization of genetic structure of alfalfa (*Medicago* sp.) from trans-Himalaya using RAPD and ISSR markers. African Journal of Biotechnology 10: 8176-8187.

Xavier, J. R., Kumar, J., and Srivastava, R. B. 2011. Characterization of genetic structure of alfalfa (*Medicago* sp.) frpm trans-Himalaya using RAPD and ISSR markers. African Journal of Biotechnilogy 10: 8176-8187.

Archive of SID

www.SID.ir