مجله علوم کشاورزی ایران
جلد ۳۶، شماره ۴، سال ۱۳۸۴ (۹۸۹-۹۷۹)

ارزیابی ساختار و تنوع ژنتیک درون و بین جمعیتی یونجه‌های زراعی (*Medicago sativa* L.) ایران با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره

محسن فلاحتی عنبران[۱]، علی‌اکبر حبشی[۲]، مسعود اصفهانی[۳]، سید ابوالقاسم محمدی[٤]، بهزاد قره‌یاضی[٥]
۱، ۲، ۵، کارشناس ارشد، استادیار و دانشیار پژوهش مؤسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی- کرج،
۳، دانشیار دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، ٤، استادیار دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز
تاریخ پذیرش مقاله ۸۳/٤/۱۷

خلاصه

بررسی ساختار و میزان تنوع ژنتیک در ذخایر توارثی گیاهی، یکی از قدم‌های اولیه در اکثر برنامه‌های اصلاحی می‌باشد. در این تحقیق تنوع و ساختار ژنتیک ٦ جمعیت یونجه زراعی (*Medicago sativa* L.) از مناطق یزد، کرمان، اصفهان، خراسان، لرستان و همدان با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره مورد ارزیابی قرار گرفت. دی‌ان‌آی ژنومی استخراج شده از نمونه‌های گیاهی با آغازگرهای مربوط به ۸ جایگاه ریزماهواره تکثیر و محصولات حاصل با استفاده از ژل پلی‌آکریل‌آمید واسرشته‌ساز الکتروفورز شدند. مجموعاً ٦٦ باند یا آلل چندشکل در جمعیت‌های مورد مطالعه مشاهده شد که میانگین تعداد آلل در هر گیاه و جایگاه برابر ۲/۲٦ بود. میانگین تنوع ژنتیک درون جمعیتی از ۰/۸۲ در جمعیت کرمان تا ۰/۹۳ در جمعیت قره‌یونجه (با منشاء همدان) متغیر بود و دو جمعیت خراسان و لرستان میانگین تنوع ژنتیک درون جمعیتی یکسانی (۰/۹۲) داشتند. سهم و درصد تنوع ژنتیک بین گیاهان درون جمعیت‌ها و بین جمعیت‌ها با استفاده از تجزیه واریانس مولکولی ارزیابی گردید. نتایج نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین جمعیت‌ها و گیاهان داخل هر جمعیت وجود دارد. تمایز ژنتیک جمعیت‌ها با استفاده از شاخص تثبیت (Fst) بعنوان معیاری از فاصله ژنتیک بررسی گردید و بر اساس فاصله دوبه‌دوی جمعیت‌ها، تفاوت معنی‌داری بین جمعیت قره‌یونجه همدان با دیگر جمعیت‌ها مشاهده شد. روابط ژنتیک بین جمعیت‌ها با استفاده از تجزیه خوشه‌ای (روش UPGMA) بر اساس ماتریس ضریب هم‌نسبی مورد بررسی قرار گرفت و دندروگرام حاصله تصویر واضحی از روابط بین جمعیت‌ها را نشان داد. در کل نتایج حاصله نشان داد که میزان تنوع درون جمعیت‌ها به مراتب بیشتر از تنوع بین جمعیت‌ها می‌باشد، بطوریکه گیاهان داخل جمعیت‌ها از هتروزیگوسی بالایی برخوردار بوده و جمعیت‌های مختلف ناهمگن یا هتروژن بودند. بنابراین می‌توان اظهار کرد که جمعیت‌های زراعی یونجه ایران یک منبع ژنتیک غنی برای مطالعات اصلاح نباتی می‌باشند. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که نشانگرهای ریزماهواره ابزار بسیار قدرتمندی برای برآورد میزان تنوع ژنتیک درون و بین جمعیت‌ها و ارزیابی روابط خویشاوندی آنها، و همچنین تمایز ژنتیک و شناسایی جمعیت‌ها می‌باشند که می‌توانند برای مدیریت ذخایر توارثی از طریق شناسایی نمونه‌های تکراری، ارزیابی خلوص بذور و نمونه‌های هم‌نام مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: یونجه، تنوع ژنتیک ، نشانگر ریزماهواره، تجزیه واریانس مولکولی، تمایز ژنتیک

مکاتبه کننده: محسن فلاحتی عنبران
e-mail: falahati_m@abrii.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

یونجه (*M. sativa* L.) یکی از مهم‌ترین گیاهان علوفه‌ای ایران و جهان به شمار می‌رود که از قفقاز، شمال غربی ایران، ارتفاعات ترکمنستان و شمال شرقی ترکیه منشا یافته است (۲۹). علی‌رغم اهمیت زراعی این گیاه، پیشرفتهای حاصل از برنامه‌های اصلاحی در این گیاه به‌علت پیچیدگی ساختار ژنتیک آن نسبت به گیاهان دیگر، چندان چشمگیر نبوده است. یونجه گیاهی اتوتتراپلوئید (۲n=4x =۳۲) و دگرگشن است که توارث تترازومی و پسروی خویش‌آمیزی شدید، مطالعات ژنتیک در جمعیت‌های یونجه را نسبت به گیاهان زراعی دیگر با مشکل مواجه می‌سازد (۲۵).

آگاهی از میزان تنوع ژنتیک ذخایر توارثی گونه‌های گیاهی در اصلاح نباتات از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشد. این موضوع خصوصاً در مورد یونجه برای تولید ارقام ساختگی مهم می‌باشد زیرا که تولید ارقام ساختگی مبتنی بر انتخاب والدین متنوع و دارای عملکرد مطلوب بوده تا در نتیجه آن، حداکثر هتروزیس در نتاج حاصل گردد(۹). از طرف دیگر اطلاع از میزان چندشکلی یا تفاوت بین نمونه‌های مختلف، به منظور کاهش حجم نمونه‌های ذخایر توارثی نگهداری شده در بانک ژن و بررسی خلوص بذر بخصوص در گیاه دگرگشنی مانند یونجه بسیار مفید خواهد بود. نشانگرهای مولکولی یکی از راهکارهای کاربردی در این زمینه می‌باشند. نشانگرهای مولکولی ابزارهای بسیار مهم و قوی در ارزیابی روابط خویشاوندی ژنتیک ، انتخاب گیاهان برتر و بررسی شباهت یا تفاوت بین نمونه‌های مختلف می‌باشند. روشهای مولکولی متعددی برای ارزیابی تنوع ژنتیک و تشخیص ذخایر توارثی در گیاهان ابداع شده‌اند. در اوایل دهه ۱۹۸۰ با ابداع تکنیک تفاوت طول قطعات حاصل از هضم[1] (RFLP) (۳) ابداع و استفاده از آن برای شناسایی ارقام مختلف گیاهان زراعی پیشنهاد شد. به‌علت وقت‌گیر بودن و نیاز به مقدار نسبتاً زیاد و خالص دی‌ان‌آ در روش RFLP ، نشانگرهای مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از جمله رپید[2] (RAPD) (۴۱، ۴۲)، توالیهای ساده تکراری[3] (SSR)(۳۸) یا ریزماهواره‌ها و چندشکلی در طول قطعات تکثیر شده[4] (AFLP)(۳۹) ابداع شدند. از نشانگر RFLP در یونجه برای تهیه نقشه‌های ژنتیک (۵، ۷، ۲۴) و همچنین شناسایی ارقام و ارزیابی تنوع ژنتیک (۶، ۱۰، ۲۳، ۳۳، ۳۴) استفاده شده است. روش رپید به‌علت غیر رادیواکتیو، ارزان و سریع بودن در اکثر مطالعات مربوط به جمعیت‌ها، جایگزین RFLP شده است. در یونجه این روش برای تجزیه و تحلیل تفرق (۱۷)، ارزیابی اینتروگرسیون ذخایر توارثی (۲۶)، ترسیم نقشه‌های ژنتیک (۵، ۱۸، ۲۴، ۴۴)، ارزیابی تنوع ژنتیک درون و بین‌گونه‌ای در یونجه‌های یکساله (۸) و ارزیابی تنوع و روابط ژنتیک بین جمعیت‌های یونجه (۱۱، ۱۲، ۱۳، ۲۲، ۲۷، ۴۳) استفاده شده است. از نشانگر AFLP نیز در یونجه جهت مطالعات ژنتیک از جمله تهیه نقشه‌های ژنتیک (۱) و بررسی تنوع ژنتیک (۴۵) استفاده شده است. اخیراً روش تفاوت طول ناشی از تکثیر ردیفهای ویژه[5] که ترکیبی از نشانگر AFLP و رتروترانسپوزونها[6] می‌باشد، برای مطالعه تنوع ژنتیک در داخل و بین گونه‌های زراعی پیشنهاد شده است (۳۲).

ریزماهواره‌ها از جمله نشانگرهای ژنتیک همبارز و چندآللی هستند که در ژنوم موجودات بطور فراوان یافت می‌شوند (۳۰، ۴۰) به‌علت چندشکلی زیاد ریزماهواره‌ها، استفاده از نشانگرهای ریزماهواره در گیاهان زراعی بویژه گیاهان دگرگشن در حال افزایش است. اولین بار چهار جایگاه کروموزومی ریزماهواره در یونجه بوسیله دیوان و همکاران (۱۹۹۷) معرفی شد و پس از آن منگونی و همکاران از ۳ تا از این جایگاه‌ها برای بررسی تنوع ریزماهواره‌ها در جمعیت‌های یونجه و ارزیابی روابط ژنتیک استفاده نمودند (۲۷). علاوه بر چهار جایگاه ریزماهواره فوق، شش جایگاه دیگر نیز برای تهیه نقشه یونجه‌های دیپلوئید و تتراپلوئید بکاربرده شده‌اند (۱۶). از ریزماهواره‌های کلروپلاستی

1. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)
2. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

3. Simple Sequence Repeat (SSR)
4. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)
5. Sequence Specific Amplification Polymorphism (S-SAP)
6. Retrotransposons

Archive of SID

www.SID.ir

نیز برای مطالعه میزان چندشکلی در ذخایر توارثی یونجه استفاده شده است(۲۸).

باتوجه به دگرگشنی و تتراپلوئید بودن یونجه (۳۶) انتظار می‌رود که تنوع ژنتیک زیادی در داخل جمعیت‌های یونجه وجود داشته باشد. علی‌رغم بومی بودن این گیاه، از میزان تنوع ژنتیک در جمعیت‌های یونجه ایران اطلاعات چندانی در دست نمی‌باشد. در این تحقیق از نشانگرهای ریزماهواره برای بررسی سودمندی و کارآیی نشانگرهای ریزماهواره در ارزیابی تنوع درون و بین جمعیت‌های یونجه و تعیین روابط خویشاوندی آنها و همچنین در تمایز ژنتیک جمعیت‌ها بررسی شده است.

مواد و روشها

مواد گیاهي

در این تحقیق از ۶ جمعیت زراعی یونجه (از مناطق مختلف جغرافیایی کشور) استفاده گردید که جمعیت‌های یزد، اصفهان، کرمان، خراسان و لرستان از بانک ژن ملی گیاهی کشور و جمعیت قره‌یونجه از مرکز تحقیقات کشاورزی همدان تهیه شدند. بذور جمعیت‌های مذکور ابتدا در ظروف پتری جوانه‌دار شده و سپس به گلدان انتقال داده شدند. پس از رشد گیاهچه‌ها (دو ماه پس از کشت) در گلخانه، از هر جمعیت ۱۰ گیاه بطور تصادفی انتخاب و از برگهای سالم و سبز هر گیاه نمونه‌برداری انجام گرفت و به $-80^{o}c$ منتقل گردید.

استخراج دي‌ان‌آ

استخراج دی‌ان‌آ مشابه روش پیشنهادی دلاپورتا و همکاران (۱۹۸۳) با تغییرات جزئی انجام گردید: برگها در حضور ازت مایع پودر شده و در لوله‌های ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شدند. مقدار ۷۵۰ میکرولیتر از بافر استخراج (۱۰۰ میلی مولار تریس-اسید کلریدریک ، ۵۰۰ میلی مولار کلرید سدیم، ۵۰ میلی مولار اتیلن دیامین تتراستیک اسید، سدیم دودسیل سولفات ۲۰٪ و ۱۰ میلی مولار بتامرکاپتواتانول) به داخل هر لوله ریخته و در $65^{o}c$ به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند . بعد از یکنواخت شدن رنگ محلول، مقدار ۳۰۰ میکرولیتر استات پتاسیم ۵ مولار به هر لوله اضافه گردید و نمونه‌ها به مدت۳۰ دقیقه در داخل یخ بر روی تکان‌دهنده قرارداده شدند. پس از سانتریفیوژ در ۱۳۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه، مایع رویی هر لوله به لوله جدیدی منتقل گردید و سپس مقدار ۴۵۰ میکرولیتر ایزوپروپانول به هر لوله اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در ^{o}c ۲۰- قرار داده شدند بعد از سانتریفیوژ در ۱۰۰۰۰ دور، دی‌ان‌آی رسوب داده شده در بافر TE(تریس-ای‌دی‌تی‌آ) حل گردید . غلظت دی‌ان‌آی استخراج شده به میزان ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر تنظیم گردید.

واكنش زنجيره‌اي پليمراز

هشت نشانگر ریزماهواره معرفی‌شده توسط دیوان و همکاران (۲۰۰۰) در این تحقیق استفاده شد(جدول۱). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به حجم ۱۵ میکرو لیتر حاوی بافرx۱۰، کلرور منیزیم ۱۰ میلی‌مولار، تک دی‌ان‌آ پلیمراز ۱/۵ واحد،۲۰ پیکو مول از هر آغازگر، dNTP ۰/۲ میلی‌مولار و ۲۰ نانوگرم از دی‌ان‌آی ژنومی هر نمونه انجام گردید. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در دستگاه Perkin Elmer مدل ۹۷۰۰ با برنامه زمانی ۵ دقیقه واسرشته‌سازی اولیه در $94^{\circ}c$، ۱۰ چرخه اولیه بصورت Touchdown (بطوریکه دمای اتصال آغازگر ۱۰ درجه بالاتر از دمای اتصال واقعی درنظر گرفته و به ازای هر چرخه، ۱ درجه از دمای اتصال کاهش یافته تا به دمای اتصال واقعی برسد) و ۲۵ چرخه شامل ۳۰ ثانیه واسرشته‌سازی در $94^{\circ}c$، ۳۰ ثانیه در $^{\circ}c$ ۵۲ (جهت اتصال آغازگرها) و ۳۰ ثانیه در $^{\circ}c$ ۷۲ (جهت بسط) انجام گردید و بسط نهایی در $^{\circ}c$ ۷۲ به مدت ۵ دقیقه انجام شد. فرآورده‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به نسبت مساوی با رنگ فورمامید(۹۸ درصد) مخلوط و مقدار ۵ میکرولیتر از آن بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید واسرشته‌ساز استاندارد (در دستگاه Squi-Gen GT، Bio Rad) بارگذاری و با توان ثابت۹۰ وات به مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز انجام گردید و رنگ‌آمیزی ژل پلی‌اکریل‌آمید با استفاده از روش نیترات نقره انجام گردید (۲).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

امتیازدهی باندها بصورت ۱ برای وجود باند و صفر برای عدم وجود باند انجام گرفت. پارامترهای مربوط به ساختار ژنتیک جمعیت از جمله تنوع ژنتیک درون جمعیتی (با محاسبه میانگین تعداد تفاوتهای دوبه‌دو در هر جایگاه)، تنوع بین

Archive of SID
www.SID.ir

جمعیتی، تجزیه واریانس مولکولی[1] (AMOVA) (۱۹) به منظور محاسبه اجزای واریانس درون جمعیتی و بین جمعیتی (با استفاده از ماتریس صفر و یک) و همچنین شاخص تثبیت[2] و ضریب هم‌نسبی[3] با استفاده از نرم‌افزار Arlequin 2.0(۳۷) محاسبه گردید. تجزیه خوشه‌ای با ترسیم دندروگرام بر اساس الگوریتم UPGMA [4] با نرم افزار NTSYS-pc 2.02 (۳۵) مبنی بر ضریب هم‌نسبی انجام گردید.

نتایج و بحث

چندشکلی نشانگرهای ریزماهواره

وجود چندشکلی در جایگاههای ریزماهواره‌ای در ۱۰ گیاه از هر جمعیت بررسی گردید. تمام ۸ جایگاه ریزماهواره بکاررفته بین گیاهان چندشکلی نشان دادند. در جدول ۱ واحدهای تکراری، تعداد آلل، دامنه اندازه و میانگین تعداد آلل در هر گیاه و همچنین شاخص تثبیت یا Fst هر جایگاه بطور جداگانه نشان داده شده است. تعداد ۶۸ آلل در مجموع ۸ جایگاه مورد بررسی مشاهده شد، بطوریکه جایگاه AFct32 با ۱۴ آلل دارای بیشترین تعداد آلل و جایگاههای AFca11 و MTLEC2A با ۴ آلل دارای کمترین تعداد آلل در بین نشانگرهای مورد استفاده بودند (جدول۱) و میانگین تعداد آلل در کل جایگاه‌ها برابر ۸ بود.

مقایسه تعداد آلل مشاهده شده برای تعدادی از جایگاهها در این تحقیق و تحقیقات قبلی نشان می‌دهد که تعداد آللها در محدوده مشابهی بوده است(جدول ۱). اندازه‌آللها در کل جایگاه‌ها از ۸۹ تا ۱۸۹ جفت باز متغیر بود که نتایج تقریباً مشابهی نیز در آزمایشات قبلی گزارش شده است (۱۵، ۲۷). تعداد کل باندهای مشاهده شده (هر باند به منزله یک آلل) در ۶ جمعیت برابر با ۱۰۷۲ بود. که جمعیت قره‌یونجه بیشترین (با میانگین ۲/۴۵ آلل) و اصفهان کمترین (با میانگین ۲/۲۱ آلل) تعداد آلل در هر گیاه\جایگاه را داشتند. میانگین تعداد آلل در هر جایگاه از ۱/۶ (در AFct11) تا ۲/۷ (در AFca16) در هر گیاه متغیر بود و میانگین تعداد آلل درکل جایگاه‌ها در هر گیاه برابر ۲/۲۶ بود. میانگین تعداد آللهای مشاهده شده در هر گیاه در ۳ جایگاه ریزماهواره (AFct32، AFca11 و AFctt1) در جمعیت‌های یونجه ایتالیا (میانگین ۲/۹۰) (۲۶) بیشتر از یونجه‌های ایران (با میانگین ۲/۵۳) بود که این اختلاف به‌علت بالا بودن فراوانی گیاهان دارای ۴ آلل مختلف در یونجه‌های ایتالیایی نسبت به یونجه‌های ایرانی می‌باشد.

شاخص تثبیت (Fst) برآورد شده در کل ۶ جمعیت بطور جداگانه در هر جایگاه نشان می‌دهد (جدول ۱) که تنوع زیادی در بین جایگاههای مورد مطالعه وجود دارد بطوریکه این شاخص در جایگاههای AFct11 و AFat15 در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود. در شکل ۱ نمونه‌ای از چندشکلی در جایگاه ریزماهواره AFct32 در تعدادی از ژنوتیپهای یونجه ایران بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمید نشان داده شده است. تعداد آلل در هر گیاه از ۱ تا ۴ متغیر بود. با توجه به اینکه که مکان و محل ژنومی هر جایگاه ریزماهواره بر روی ژنوم مشخص می‌باشد و در یک گیاه اتوتتراپلوئید حداکثر چهار آلل از هر ژن وجود دارد بنابراین تعداد باند که هر کدام به منزله یک آلل ریزماهواره می‌باشد در گیاهان تتراپلوئید حداکثر ۴ تا خواهد بود.

منحنی پراکنش تعداد کل آللهای مشاهده شده درگیاهان در ۸ جایگاه ریزماهواره در شکل ۲ نشان می‌دهد که توزیع و پراکنش آللها در بین گیاهان شبیه به منحنی نرمال بوده و گیاهان دارای تعداد آلل و چندشکلی حداقل و حداکثر در بین جمعیت‌های مورد مطالعه نادر هستند. با توجه به اینکه جمعیت‌های مورد بررسی بصورت طبیعی مورد کشت و کار قرار گرفته‌اند و هیچگونه برنامه‌های به‌نژادی به منظور انتخاب گیاهان برتر بر روی آنها صورت نگرفته است بنابراین انتظار می‌رود که آللها در بین گیاهان بصورت تصادفی توزیع شده باشند و گیاهان با تعداد آلل حداقل و حداکثر نسبت به میانگین دارای فراوانی پایینی باشند.

1. Analysis of molecular variance (AMOVA)
2. Fixation index (Fst)
3. Coancestry coefficient
4. Unweighted pair group means analysis (UPGMA)

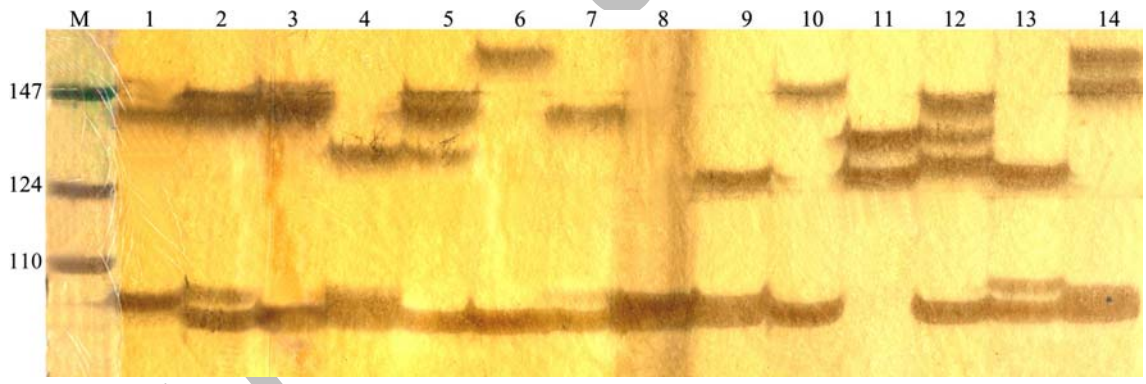
Archive of SID

www.SID.ir

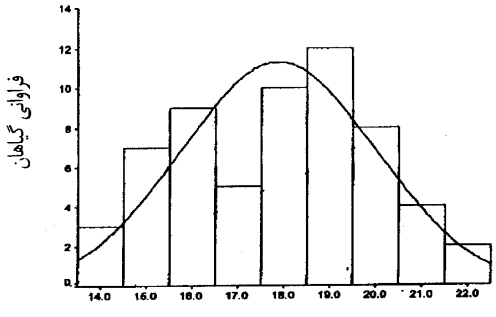
جدول ۱- تعداد آلل، میانگین تعداد آلل در هر گیاه، دامنه اندازه آللها و شاخص تثبیت در جایگاههای ریزماهواره.

مکان ژنی	واحد تکراری	تعداد آلل		دامنه اندازه آلل (جفت باز)		میانگین تعداد آلل در هر گیاه		شاخص
		تحقیقات قبلی	تحقیق حاضر	تحقیقات قبلی	تحقیق حاضر	تحقیق قبلی(M)[a]	تحقیق حاضر	تثبیت
AFct32	(CT)۱۴	۱۴ (M) ۱۴ (D)	۱۴	۱۳۲-۱۶۸(M) ۱۰۰-۱۸۸(D)	۱۰۳-۱۶۶	۲/۸۰ (۱-۴)	۲/۶۳ (۱-۴)	۰/۰۰۱۷ ns
AFca11	(CA)۱۱	۹ (M) ۱۰ (D)	۱۲	۱۱۹-۱۹۵(M) ۱۳۳-۱۷۷ (D)	۱۳۹-۱۸۸	۲/۸۰ (۱-۴)	۲/۵۷ (۱-۴)	-۰/۰۰۶۶ ns
AFca16	(CA)۱۲	-	۸	-	۹۸-۱۰۳	-	۲/۷ (۱-۴)	۰/۰۰۷۹ ns
AFctt1	(CTT)۳ (CAA)۹	۱۴ (M) ۱۱ (D)	۱۱	۱۰۰-۲۰۲(M) ۱۰۲-۱۳۵(D)	۸۹ ۱۰۰-۱۳۰	۳/۱۰ (۱-۴)	۲/۳۵ (۱-۴)	۰/۰۰۹۸ ns
AFat15	(AT)۲۳	-	۶	-	۱۴۷-۱۶۹	-	۱/۹۷ (۱-۴)	۰/۰۴۸۲*
AFct45	(CT)۳ AT(CT)۱۸	-	۷	-	۱۳۲-۱۴۴	-	۲/۰۰ (۱-۳)	۰/۰۳۴۱ ns
AFct11	(CT)۱۲	-	۶	-	۱۷۵-۱۸۸	-	۱/۶۰ (۱-۴)	۰/۰۹۱۴*
MTLEC2A	(AT)۱۹	۷ (D)	۴	۱۳۶-۲۳۶(D)	۱۸۰-۱۸۹	-	۲/۳۱ (۱-۴)	۰/۰۱۸۳ns
مجموع			۶۸			۸/۷	۱۸/۱۳	
میانگین			۸/۵			۲/۹۰	۲/۲۶	۰/۰۲۴

ns: غیر معنی‌دار و *: معنی‌دار در سطح ۵ درصد؛ a- اعداد داخل پرانتز دامنه آلل‌های مشاهده شده در هر ژنوتیپ می‌باشند؛ D و M به ترتیب نشان‌دهنده جایگاه‌های استفاده شده بوسیله دیوان و همکاران (۱۹۹۷) و منگونی و همکاران (۲۰۰۰a) می‌باشد.



شکل ۱- چندشکلی آللهای ریزماهواره در جایگاه AFct32. M نشانگر اندازه (جفت باز)، شماره ۱۴-۱ ژنوتیپ‌های یونجه زراعی می‌باشند



شکل ۲- توزیع تعداد کل آللهای مشاهده شده (مجموع آللها در ۸ جایگاه ریزماهواره) در بین گیاهان داخل جمعیت‌ها.

تنوع ژنتیك درون جمعیت‌هاي یونجه

در جدول۲ برآورد میانگین تنوع ژنتیک در هر جمعیت نشان داده شده است بطوریکه جمعیت قره‌یونجه همدان بیشترین (با میانگین ۰/۹۲۵) و جمعیت کرمان کمترین (با میانگین۰/۸۲۰) میزان تنوع ژنتیک را داشتند و همچنین میزان تنوع ژنتیک در دو جمعیت خراسان و لرستان با هم برابر بود (با میانگین ۰/۹۲۲). تنوع ژنتیک زیاد درون‌جمعیتی یونجه در ایران علاوه‌بر اینکه نشان‌هنده هتروزیگوسیتی زیاد آنها می‌باشد نشان‌دهنده ناهمگنی زیاد جمعیت‌ها نیز می‌باشد که این تنوع و

Archive of SID
www.SID.ir

ناهمگنی زیاد از ماهیت تتراپلوئیدی، دگرگشنی و تکثیر بوسیله بذر (که باعث اختلاط بذور جمعیت‌های مختلف می‌گردد) ناشی می‌گردد. میزان شباهت ژنتیک (بر اساس ضریب تشابه جاکارد) از ۰/۲۳ تا ۰/۶۴ متغیر بود که نشان‌دهنده شباهت ژنتیکی پایین بین گیاهان داخل جمعیت‌های یونجه می‌باشند (داده‌ها نشان داده نشده‌اند). با توجه به تنوع درون جمعیتی زیاد می‌توان تصور کرد که هر گیاه داخل جمعیت به منزله یک رقم هتروزیگوت می‌باشد.

جدول۲- میانگین تنوع ژنتیک درون جمعیت‌های یونجه با برآورد اشتباه معیار.

جمعیت	میانگین تنوع ژنتیک به‌همراه اشتباه معیار
یزد	۰/۸۷ ±۰/۵۱
کرمان	۰/۸۲ ± ۰/۴۸
اصفهان	۰/۸۸ ± ۰/۵۱
خراسان	۰/۹۲ ± ۰/۵۳
لرستان	۰/۹۲ ± /۵۳
قره‌یونجه	۰/۹۳ ± ۰/۵۳
میانگین	۰/۸۹ ± ۰/۵۱

مقایسه نتایج این مطالعه و نتایج منگونی و همکاران(۱۹۹۳) نشان می‌دهد که میزان تنوع ژنتیک در بین جمعیت‌های یونجه ایران (۰/۸۹) خیلی بیشتر از جمعیت‌های ایتالیایی (۰/۲۹) می‌باشد. با توجه به این نتایج می‌توان اظهار نمود که جمعیت‌های یونجه ایران (با توجه به اینکه یکی از مراکز تنوع یونجه، ایران می‌باشد)، ذخایر توارثی با ارزشی برای مطالعات به‌نژادی خواهند بود. وجود تنوع زیاد در یونجه در آزمایشات دیگری بوسیله نشانگرهای رپید (۱۱، ۱۳، ۲۱، ۲۷)، RFLP (۶، ۲۳، ۳۳، ۳۴) ریزماهواره‌های کلروپلاستی (۲۸) و هسته‌ای (۲۷) گزارش شده است.

برای برآورد هتروزیگوسیتی جمعیت‌های زراعی در هر یک از جایگاه‌های ریزماهواره، نسبت گیاهان حاوی یک، دو، سه و چهار آلل مختلف بطورجداگانه در هشت جایگاه ریزماهواره محاسبه گردید (جدول ۳). از اعداد جدول مذکور می‌توان استنباط نمود که فراوانی گیاهان دارای ۱ و ۴ آلل در هر جایگاه پایین‌تر از فراوانی گیاهان دارای ۲ و ۳ آلل می‌باشند که نشان‌دهنده توزیع تصادفی آللها در ژنوم یونجه می‌باشند.

با فرض اینکه گیاهان دارای یک آلل در هر جایگاه هموزیگوت و گیاهان با بیش از یک آلل هتروزیگوت باشند نتایج جدول ۳ نشان می‌دهد که بیش از ۸۴ درصد گیاهان حاوی بیش از یک آلل هستند که نشان‌دهنده سطح بالای هتروزیگوسیتی در درون جمعیت‌ها می‌باشد. هتروزیگوسیتی زیاد درون جمعیت‌های یونجه ناشی از ماهیت دگرگشنی، ژنوم بزرگ و اتوتتراپلوئیدی می‌باشد. در برنامه‌های اصلاحی که هدف انتخاب والدین تلاقی برای بهره‌گیری از حداکثر هتروزیس باشد احتمال می‌رود که بتوان براساس داده‌های نشانگرهای ریزماهواره، گیاهان دارای ۲، ۳ و ۴ آلل را به منظور تجمع حداکثر هتروزیس در نتاج انتخاب نمود. وجود هتروزیگوسیتی زیاد در یونجه‌های زراعی در آزمایش دیگری که بوسیله نشانگرهای ریزماهواره انجام گرفته است گزارش شده است(۲۷).

جدول ۳- میانگین نسبت گیاهان حاوی یک، دو، سه و چهار آلل مختلف به تفکیک در هر جایگاه ریزماهواره و در هر جمعیت.

تعداد آللهای مختلف در گیاه/ جایگاه	جایگاه								
	AFca32	AFca11	AFca16	AFctt1	AFat15	AFct45	AFct11	MTLEC2A	میانگین
۱	۰/۰۸	۰/۰۷	۰/۰۰	۰/۱۳	۰/۲۵	۰/۱۲	۰/۵۴	۰/۱۲	۰/۱۶
۲	۰/۳۶	۰/۴۰	۰/۴۰	۰/۴۴	۰/۶۰	۰/۷۶	۰/۳۵	۰/۴۶	۰/۴۷
۳	۰/۴۱	۰/۴۳	۰/۵۰	۰/۳۸	۰/۱۳	۰/۱۲	۰/۰۷	۰/۴۰	۰/۳۱
۴	۰/۱۵	۰/۱۰	۰/۱۰	۰/۰۵	۰/۰۲	۰/۰۰	۰/۰۴	۰/۰۲	۰/۰۶

Archive of SID

www.SID.ir

توزیع فراوانی گیاهان حاوی۱،۲، ۳ و ۴ آلل مختلف در ۳ جایگاه ریزماهواره AFct32، AFca11 و AFctt1 در جمعیت‌های یونجه ایرانی و ایتالیایی مقایسه گردید(داده‌ها نشان داده نشده‌اند). نسبت زیادتر گیاهان حاوی ۴ آلل در جمعیت‌های ایتالیایی احتمالاً گواه این مطلب است که برنامه‌های اصلاحی به منظور افزایش هتروزیگوسیتی در این جوامع انجام گرفته‌اند در حالی که جمعیت‌های زراعی یونجه ایران بصورت طبیعی کشت و کار شده و تابحال هیچگونه عملیات اصلاحی بر روی آنها انجام نگرفته است.

تنوع ژنتیك بین‌جمعیتي

به منظور ارزیابی درصد و سهم تنوع ژنتیک درون و بین جمعیتی در سطح مولکولی تجزیه واریانس مولکولی انجام گردید که نتایج در جدول ۴ نشان داده شده است. اگرچه تنوع معنی‌داری در بین جمعیت‌ها در سطح احتمال ۵ درصد مشاهده شد ولی تنها ۲ درصد از تنوع کل به علت تنوع و تمایز بین جمعیت‌ها بود درحالیکه ۹۸ درصد تنوع کل به تفاوت بین ژنوتیپ‌های داخل جمعیت‌ها بر می‌گردد. درصد تنوع درون جمعیتی زیاد و بین‌جمعیتی کم برآورد شده در این تحقیق با نتایج منگونی و همکاران که با استفاده از ۳ جایگاه ریزماهواره هسته‌ای (۲۷) و همچنین جایگاههای ریزماهواره کلروپلاست (۲۸) ارزیابی شده است، مطابقت داشت.

یکی از دلایل تنوع بین‌جمعیتی کم (۲ درصد از کل تنوع) احتمالاً می‌تواند ناشی از ادغام و همپوشانی زیاد جمعیت‌های زراعی باشد که در نتیجه پدیده جریان ژن[1] در بین جمعیت‌ها حاصل شده است. به نظر می‌رسد که جمعیت‌های مختلف کــه توسط زارعین کشت و کار می‌شده‌اند، با گذشت زمان باهم اختلاط یافته و در نتیجه جمعیت‌هایی با مخلوطی از ژنوتیپهای مختلف بوجود آمده است. دلیل احتمالی دیگر این است که جمعیت‌های یونجه زراعی دگرگشن بوده و میزان دگرگشنی بستگی به فعالیت حشرات گرده‌افشان دارد که این عامل نیز در موقع گرده‌افشانی باعث انتقال گرده از یک جمعیت به جمعیت دیگر می‌گردد. بنابراین خودبه‌خود این عوامل باعث افزایش همپوشانی ژنتیکی جمعیت‌های یونجه نسبت به هم شده است. توجیه ۹۸ درصد از تنوع کل بر اساس تنوع درون جمعیتی، ناشی از تفاوت خیلی زیاد بین گیاهان و ژنوتیپهای درون جمعیت‌ها می‌باشد.

تمایز ژنتیك

برای بررسی تمایز ژنتیک جمعیت‌ها، فاصله ژنتیک بین جمعیت‌ها بر اساس شاخص تثبیت (Fst) دوبه‌دوی جمعیت‌های زراعی محاسبه گردید (جدول ۵). شاخص تمایز ژنتیک کل جمعیت‌های مورد مطالعه از نظر آماری در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود (Fst = ۰/۰۲۴، P< ۰/۰۰۰۷۵). مقدار تمایز پایین یونجه‌های زراعی ایران به‌علت همپوشانی زیاد آنها می‌باشد، زیراکه در گزارشات قبلی در یونجه (بونین و همکاران، Fst= ۰/۳۸(۴)؛ مولر و همکاران، Fst= ۰/۱۶(۳۱)) میزان تمایز بالا به‌علت استفاده از منابع ژنتیک مختلف از مناطق جغرافیایی متفاوت و حتی زیرگونه‌های مختلف می‌باشد. اگرچه در تعدادی از گزارشات در جمعیت‌های زراعی یونجه داده‌های مولکولی توانستند جمعیت‌های زراعی از هم‌دیگر متمایز کنند (۲۷، ۲۸، ۳۳) ولی در بررسیهای دیگر هیچ تمایز معنی‌داری در بین جمعیت‌های زراعی یونجه مشاهده نگردیده است (۱۱، ۲۱، ۲۲، ۳۱).

1. Gene flow

جدول۴- تجزیه واریانس مولکولی در جمعیت‌های زراعی برای ۶۰ گیاه با ۶۸ آلل ریزماهواره(P< ۰/۰۰۰۷۵ و Fst =۰/۰۲۴).

منبع تنوع	درجه آزادی	مجموع مربعات	اجزاء واریانس	درصد تنوع	احتمال
بین‌جمعیتی	۵	۲۲/۵	۰/۰۸۸۷	۲/۴۳	۰<۰/۰۰۰۷۵
درون‌جمعیتی	۵۴	۱۹۲/۴	۳/۵۶۳	۹۷/۵۷	
کل	۵۹	۲۱۴/۶۵	۳/۶۵		

مقدار احتمال با استفاده از آزمون جایگشت (Permutation test) (۱۶۰۰۲ جایگشت تصادفی) برآورد گردیده است.

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۵ - میانگین تفاوتهای دوبه‌دوی جمعیت‌های زراعی و آزمون معنی‌داربودن آنها.

جمعیت	یزد	کرمان	اصفهان	خراسان	لرستان
کرمان	۰/۱۲ ns				
اصفهان	۰/۲۱ ns	۰/۱۲ ns			
خراسان	۰/۱۷ ns	۰/۳۰*	-۰/۰۵۱ ns		
لرستان	۰/۰۳۱ ns	۰/۲۵*	۰/۰۸ ns	-۰/۱۰ ns	
قره یونجه	۰/۴۶*	۰/۴۲*	۰/۲۰*	۰/۳۱*	۰/۱۱ ns

* : معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد (P<۰/۰۵)،

ns: غیرمعنی‌دار (P>۰/۰۵).

محاسبه Fstهای دوبه‌دوی جمعیت‌ها نشان داد که جمعیت قره‌یونجه به‌استثنای لرستان، با بقیه جمعیت‌های مورد بررسی در سطح احتمال ۵ درصد دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشد. همانطور که در جدول ۵ مشاهده می‌شود، فاصله ژنتیک دوبه‌دوی جمعیت قره‌یونجه با جمعیت‌های دیگر خیلی بیشتر از تفاوت بین بقیه جمعیت‌ها است. تفاوت معنی‌دار جمعیت قره‌یونجه با بقیه جمعیت‌ها بخاطر ناهمگنی و هتروزیگوسیتی درون‌جمعیتی زیاد و همچنین وجود باند اختصاصی در این جمعیت می‌باشد. بطوریکه در تمام ژنوتیپهای جمعیت قره‌یونجه آللی به طول ۸۹ جفت باز مشاهده گردید که در بقیه این جمعیت‌ها حضور نداشت که از این باند یا آلل اختصاصی می‌توان برای اهداف کاربردی نظیر شناسایی، تعیین خلوص و بررسی اختلاط جمعیت‌ها استفاده نمود بطوریکه این اهداف خصوصاً در مورد گیاه دگرگشنی مانند یونجه از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد .

روابط ژنتیك بین جمعیت‌ها

تجزیه خوشه‌ای با استفاده از روش UPGMA بر اساس ضریب همنسبی جهت گروه‌بندی جمعیت‌ها انجام گردید (داده‌ها نشان داده نشده‌اند). در دندروگرام حاصله، جمعیت قره‌یونجه نسبت به جمعیت‌های دیگر در یک دسته مجزا قرار گرفت که نشان‌دهنده روابط خویشاوندی دور این جمعیت با سایر جمعیت‌ها می‌باشد. الگوی گروه‌بندی با استفاده از تجزیه خوشه‌ای مطابقت کاملی با نتایج تجزیه واریانس مولکولی داشت. نتایج نشان دادند که دو جمعیت یزد و کرمان (که از مناطق گرمسیر کشور می‌باشند) خویشاوندی نزدیکتری نسبت به جمعیت‌های دیگر دارند. در بین جمعیت‌های مورد مطالعه بیشترین شباهت بین دو جمعیت خراسان و لرستان مشاهده شد. این شباهت بالا احتمالاً ناشی از تنوع ژنتیک درون جمعیتی یکسان (۰/۹۲۲) و همپوشانی ژنتیکی زیاد آنها می‌باشد. احتمال می‌رود که این دو جمعیت از یک جمعیت اولیه منشا شده‌اند و یا اینکه در اصل یک جمعیت بوده که به دلایل نامعلوم به مرور زمان اسامی متفاوت به خود گرفته‌اند. می‌توان اظهار کرد که شناسایی نمونه‌های تکراری و مشابه، که یکی از اهداف مدیریت ذخایر توارثی نگهداری شده در بانک ژن‌ها است،بااستفاده از نشانگرهای ریزماهواره امکانپذیر می‌باشد.

با توجه به اینکه ایجاد لاین خالص در یونجه به‌علت خودناسازگاری و حساسیت شدید به خویش‌آمیزی میسر نمی‌باشد بنابراین اصلاحگران از روشهای اصلاحی دیگر از قبیل ایجاد ارقام سنتتیک یا ساختگی برای اصلاح این گیاه استفاده می‌نمایند. هدف از ایجاد چنین ارقامی، بهره‌برداری از پدیده هتروزیس می‌باشد. بررسیها نشان داده‌اند که بیشترین مقدار هتروزیس از تلاقی والدین با فاصله ژنتیکی زیاد حاصل می‌شود (۶، ۹). بر اساس نتایج حاصل می‌توان اظهار کرد که جمعیت‌های قره‌یونجه و یزد مواد ژنتیک مناسبی برای ایجاد ارقام سنتتیک جدید در یونجه می‌باشند. بنابراین انتظار می‌رود به دلیل روابط خویشاوندی دور این دو جمعیت که دارای ترکیبات ژنی متفاوت خواهند بود و میزان تنوع نسبتاً بالای جمعیت قره‌یونجه، هتروزیس بیشتری در نتاج حاصل از آنها مشاهده گردد.

تنوع ژنتیک زیاد در داخل جمعیت‌ها نشان می‌دهد که این جمعیت‌ها منابع ژنتیک با ارزشی برای انتخاب ژنوتیپهای برتر جهت استفاده در بلوکهای تلاقی برای تولید ارقام سنتتیک با حداکثر هتروزیس می‌باشند. این بررسی بخوبی نشان می‌دهد که نشانگرهای ریزماهواره ابزار ایده‌آلی برای ارزیابی تنوع و روابط ژنتیک جمعیت‌ها می‌باشند. هرچند که ارزیابی دقیق تنوع ژنتیک بوسیله استفاده از تعداد زیاد نشانگرها همراه با صفات مورفولوژیک تحقق می‌یابد. ولی با وجود این، نتایج نشان دادند که مجموعه نشانگرهای استفاده شده در این تحقیق برای اهدافی نظیر تمایز، شناسایی، ارزیابی تنوع و روابط ژنتیک جمعیت‌های دگرگشن یونجه سودمند بوده و همچنین می‌توانند

Archive of SID

www.SID.ir

برای مدیریت ذخایر توارثی از طریق شناسایی نمونه‌های تکراری، ارزیابی خلوص بذور و نمونه‌های هم‌نام کارآمد باشند. در نهایت با تعیین ژنوتیپ و اثرانگشت گیاهان با نشانگرهای ریزماهواره علاوه بر حفظ حقوق اصلاحگران نباتات، می‌توان از تبادلات برون‌مرزی این ذخایر ارزشمند و استفاده‌های غیرقانونی از منابع ژنتیک ملی کشور جلوگیری نمود.

سپاسگزاری

از جناب آقای دکتر جواد مظفری رئیس بانک ژن ملی گیاهی کشور به‌خاطر فراهم نمودن مواد ژنتیک استفاده شده در این تحقیق تشکر و قدردانی می‌گردد. از دو داور محترم بی‌نام که زحمت بررسی این مقاله را بر عهده داشتند و به نکات ارزشمند و مهم اشاره نمودند سپاسگزاری می‌گردد.

REFERENCES

1. Barcaccia, G., E. Albertini, S. Tavoletti, M. Falcinelli, & F. Veronesi. 1999. AFLP fingerprinting in *Medicago spp*.: Its development and application in linkage mapping. Plant Breeding. 118: 335-341.
2. Bassam, B. J., J. G. Caetano-Anolles, & P. M. Gressho. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 19: 680-683.
3. Botstein, D., R. L. White, M. Skolmick, & R. W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. Am. J. Hum. Genet. 32: 314-332.
4. Bonnin, I. & J. Ronfort. 2001. Spatial effect and rare outcrossing events in *M. truncatula* (Fabaceae). Molecular Ecology. 10: 1372-1383.
5. Brouwer, D. J. & T. C. Osborn. 1999. A molecular marker linkage map of tetraploid alfalfa (*Medicago sativa* L.). Theor. Appl. Genet. 7,8: 1194-1200.
6. Brummer, E. C., G. Kochert, & J. H. Bouton. 1991. RFLP variation in diploid and tetraploid alfalfa. Theor. Appl. Genet. 83:89-96.
7. Brummer, E. C., J. H. Bouton, & G. Kochert. 1993. Development of an RFLP map in diploid alfalfa. Theor. Appl. Genet. 86: 329-332.
8. Brummer, E. C., J. H. Bouton, & G. Kochert. 1995. Analysis of annual *Medicaogo* species using RAPD markers. Genome. 38: 362-367.
9. Brummer, E. C. 1999. Capturing hetrosis in forage crop cultivar development. Crop Sci 939- 943.
10. Businelli, S., F. Pupilli, F. Damiani, & S. Arcioni S. 1993. Selection of homologous probes for the characterization of *Medicago* genotypes through RFLP analysis. J. Genet. Breed. 47: 337-340.
11. Crochemore, M. L., C. Huyghe, M. C. Kerlan, F. Durand & B. Julier. 1996. Partitioning and distribution of RAPD variation in a set of populations of *Medicago sativa* complex. Agronomie. 16: 421-432.
12. Crochemore, M. L., C. Huyghe, C. Ecalle, & B. Julier. 1998. Structuration of alfalfa genetic diversity using agronomic and morphological characteristcs, Relationship with RAPD markers. Agronomie 18: 79-94.
13. Dehgan-shoar, M., T. G. Hampton, & S. E. Gardiner. 1997. Genetic analysis among and within population forming ecotypes and cultivars of lucerne, *Medicago sativa* (Legominosae), using RAPD fragments. Pl Syst Evol. 208: 107- 119.
14. Dellaporta, S. L., J. Wood, & J. B. Hicks. 1983. A plant DNA minipreparation: Version II. Plant Mol Bio Rep. 1: 19-21.
15. Diwan, N., A. A. Bhagwat, G. B. Bauchan, & P. B. Cregan. 1997. Simple sequence repeat DNA markers in alfalfa and perennial and annual *Medicago* species. Genome. 40:887-895.
16. Diwan, N., J. H. Bouton, G. Kochert, & P. B. Cregan. 2000. Mapping simple sequence repeats (SSR) DNA markers in diploid and tetraploid alfalfa. Theor. Appl. Genet. 101:165-172.
17. Echt, C. S., L. A. Erdahl, & T. J. McCoy. 1991. Genetic segregation of random amplied polymorphic DNA in diploid cultivated alfalfa. Genome. 35: 84-87.
18. Echt, C. S., K. K. Kidwell, S. J. Knapp, T. C. Osborn, & T. J. McCoy. 1993. Linkage mapping in diploid alfalfa (*Medicago sativa*). Genome. 37: 61-71.

Archive of SID

www.SID.ir

19. Excoffier, L., P. E. Smouse, & M. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics. 131: 479-491.
20. Gherardi, M., B. Mangin, B. Goffinet, D. Bonnet, & T. Huguet. 1998. A method to measure genetic distances between allogamous populations of alfalfa (*Medicago sativa*) using RAPD molecular markers. Theor. Appl. Genet. 96: 406-412.
21. Jenczewski, E., M. Angevain, A. Charrier, G. Genier, J. Ronfort, & J. M. Prosperi. 1998. Contrasting patterns of genetic diversity in neutral markers and agromorphogical traits in wild and cultivated populations of *Medicago sativa* L. from Spain. Genetics Selection Evolution. 30: S103-S119.
22. Jenczewski, E., J. M. Prosperi, & J. Ronfort. 1999. Differentiation between natural and cultivated populations of *Medicago sativa* (Leguminosae) from Spain: analysis with random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and comparison with allozymes. Mol. Ecol. 8: 1317-1330.
23. Kidwell, K. K., D. F. Austin, & T. C. Osborn. 1994. RFLP evaluation of nine Medicago populations representing the original germplasm sources for north American alfalfa cultivars. Crop Sci. 34:230-236.
24. Kiss, G. B., G. Csanadi, K. Kalman, P. Kalo, & L. O. Kresz. 1993. Construction of a basic genetic map for alfalfa using RFLP, RAPD, Isozyme, and morphological markers. Mol. Gen. Genet. 238:129-137.
25. McCoy, T. J. & E. T. Bingham. 1988. Cytology and cytogenetics of alfalfa. In: A. A. Hanson, D. K. Barnes, and R. R. Hill (eds), Alfalfa and Alfalfa Improvement, Monogr. 29, 737-776. Soc. Agron., Madison.
26. McCoy, T. J. & C. S. Echt. 1993. Potential of trispecies bridge crosses and random amplified polymorphic DNA markers for introgression of *Medicago daghestanica* and *M. pironae* germplasm into alfalfa (*M. sativa*). Genome. 36:594-601.
27. Mengoni, A., A. Gori & M. Bazzicalupo. 2000a. Use of RAPD and microsatellite (SSR) variation to assess genetic relationships among populations of tetraploid alfalfa, *Medicago sativa*. Plant breeding. 119: 311-317.
28. Mengoni, A., C. Ruggini, G. G. Vendramin, & M. Bazzicalupo. 2000b. Chloroplast microsatellite variations in tetraploid alfalfa. Plant breeding. 119: 509-512.
29. Michaud, R., W. F. Lehman, & M. D. Runbaugh. 1988. World distribution and historical development. In: A. A. Hanson, D. K. Barnes, and R. R. Hill (eds), Alfalfa and Alfalfa Improvement, Monogr. 29. Soc. Agron., Madison.
30. Morgante, M. & A. M. Olivieri. 1993. PCR amplified microsatellites as markers in plant genetics. Plant J. 3: 175-179.
31. Muller, M. H., M. Prosperi, S. Santoni, & J. Ronfort. 2001. How mitochondrial DNA diversity can help to understand the dynamics of wild-cultivated complexes. The case study of *Medicago sativa* in Spain. Molecular Ecology. 10: 2753-2763.
32. Porceddu, A., E. Albertini, G. Barcaccia, G. Marconi, F. Bertoli, & F. Veronesi. 2002. Development of S-SAP markers based on an LTR- like from *Medicago sativa* L., Mol Genet Genomics. 267:107-114.
33. Pupilli, F., S. Businelli, F. Paolocci, C. Scotti, F. Damiani, & S. Arcioni. 1996. Extent of RFLP variability in tetraploid populations of alfalfa, *Medicago sativa*. Plant Breeding. 115:106-112.
34. Pupilli, F., P. Labombarda, C. Scotti., & S. Arcioni. 2000. RFLP analysis allows for the identification of alfalfa ecotypes. Plant Breeding. 119:271-276.
35. Rohlf, F. J. 1998. NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.02. Exeter Software, New York**.**
36. Ronfort, J., E. Jenczewski, T. Bataillon, & F. Rousset. 1998. Analysis of population structure in autotetraploid species. Genetics. 150: 921-930.
37. Schneider, S., J. M. Kueffer, D. Roessli, & L. Excoffier. 2000. ARLEQUIN: a Software for Population Genetics Data Analysis, Version2.0 University of Geneva, Geneva.

Archive of SID

www.SID.ir

38. Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequence as a general source for polymorphic DNA markers. Nucl. Acids Res. 7:6463-6470.
39. Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, T. Relman, M. Kaiper, & M. Zabeau. 1995. AFLP: a new thechniques for DNA fingerprinting, Nucl. Acids Res. 23:4407-4414.
40. Wang, Z., J. L. Weber, G. Zhang, & S. D. Tanksley. 1994. Survey of plant short tandem DNA repeats. Theor. Appl. Genet. 88: 1-6.
41. Welsh, J. & M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucl. Acids Res. 18:7213-7218.
42. Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, & S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl. Acids Res. 18:6531-6535.
43. Yu, P., & K. P. Pauls. 1993a. Rapid estimation of genetic relatedness among heterogeneous populations of alfalfa by random amplification of bulked genomic DNA samples. Theor. Appl. Genet. 86:788-794.
44. Yu, P., & K. P. Pauls. 1993b. Segregation of random amplified polymorphic DNA markers and strategies for molecular mapping in tetraploid alfalfa. Genome. 36: 844-851.
45. Zaccardelli, M., S. Gnocchi, M. Carelli, & C. Scotti. 2003. Variation among and within Italian alfalfa ecotypes by means of bio-agronomic characters and amplified fragment length polymorphism analyses. Plant Breeding. 122: 61-65

Archive of SID

www.SID.ir