

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<sup>۱</sup>، پروین صالحی‌شانجانی<sup>۲</sup>، علی اشرف جعفری<sup>۳</sup> و  
غلامرضا بخشی‌خانیکی<sup>۴</sup>

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.، صالحی‌شانجانی، پ.، جعفری، ع. ا. و بخش خانیک، 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 رسید ( $P=0/10$  و  $R=0/281$ ). 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 سیستماتیک ژرم‌پلاسما که الگو پروتئینی متفاوتی داشته و ویژگی‌های کمی بهتری دارند حاصل شود.

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

#### مقدمه

یونجه (*Medicago sativa* L.) از مهم‌ترین گیاهان علوفه‌ای بومی ایران است که در شرایط متنوع آب و هوایی می‌روید. یونجه علاوه بر این که علوفه‌ای با کیفیت بالا از مواد مغذی تولید می‌کند تأثیر مثبتی بر محیط خاک نیز می‌گذارد. یونجه گیاهی اتوتتراپلوئید ( $2n = 4x = 32$ ) 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 گزینش بنا نهاده شده است، برای انجام یک برنامه به‌نژادی موفق و تولید ارقام زراعی جدید وجود اطلاعاتی درباره تنوع ژنتیکی ژرم پلاسما 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 خطر آفرین 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 از آنجایی که این ویژگی‌ها تحت تأثیر عوامل محیطی بوده و در بسیاری مواقع تنوع مشاهده شده پلاستیسیته است، مطالعه آن‌ها برآورد صحیحی را از میزان تنوع ژنتیکی به دست نخواهند داد. در حالی که عوامل محیطی نمی‌توانند بسیاری از نشانگرهای ملکولی و بیوشیمیایی را متأثر 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)؛

تنوع ژنتیکی جمعیت‌های وحشی ایرانی یونجه...

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 پلی مورفیسم  
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.

(Nisar et al., 2006)، *Avena fatua*  
(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، آگرومیکسی، ایزوآنزیمی  
و الگو پراکنش جمعیت‌های وحشی  
یونجه به خوبی 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  
(Xavier et al., 2011؛ Tucak et al., 2008)  
(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 هیچ گونه  
اطلاعاتی در مورد تنوع ژنتیکی جمعیت‌های  
وحشی یونجه در ایران وجود ندارد و مطالعات  
انجام شده بر روی ارقام زراعی یونجه متمرکز

## 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، Na<sub>2</sub>EDTA، 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 همگنها با دور ۱۱۰۰۰ xg 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 ۰/۰۲٪، گلیسرول ۱٪ و برموفنل بلو ۰/۰۲٪) به نسبت ۱:۱ مخلوط و به میکروتیوپ دربار 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 پلی‌اکریل‌آمید (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 ۰/۲۵٪ و اسید استیک ۱۰٪) رنگ‌آمیزی شدند. ژل‌ها تا ظاهرسازی باندهای پروتئین در محلول رنگ‌بر (شامل متانول ۰/۲۵٪ و اسید استیک ۱۰٪) قرار گرفتند. دستگاه مولد برق با ولتاژ ۱۸۰ ولت و شدت جریان ۴۰ میلی‌آمپر تنظیم شد. زمان جداسازی پروتئین حدود ۵ ساعت و میزان حرکت عصاره در ژل ۱۰ سانتی‌متر بود. اطلاعات حاصل از پروتئین‌های کل به صورت باندهای مجزای پروتئینی برای هر گیاه روی ژل پلی‌اکریل‌آمید 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

## نتایج و بحث

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

الگوی الکتروفورز پروتئین‌های کل یونجه در میان 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 ارومیه ۳ و مسجد سلیمان با ۴۲ باند بیشترین تعداد باندها و دو جمعیت تبریز ۱ 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 ارومیه ۲ 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 ۰/۳۰ 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

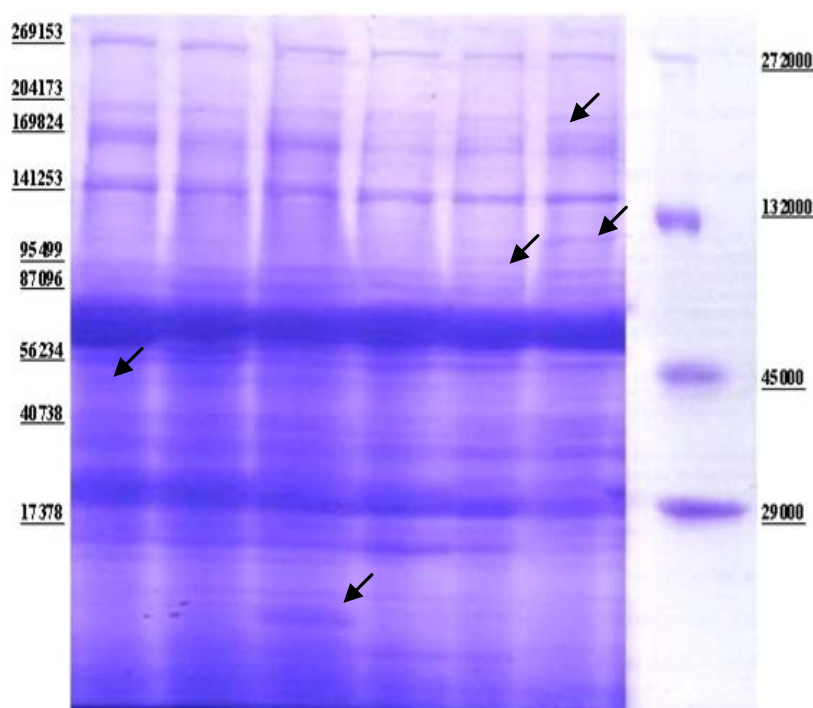
پلی مورفیسم باندها با نرم‌افزار NTSYS-pc (Rohlf, 2004) محاسبه شد. تسهیم گوناگونی ژنتیکی درون و بین گروهی توسط تجزیه واریانس ملکولی AMOVA (Excoffier *et al.*, 1992) و برنامه نرم‌افزاری 1.1 ARLEQUIN (Schnieder *et al.*, 1997) تعیین شد. اهمیت هر جزء واریانس با آزمون Permutation (Excoffier *et al.*, 1992) 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 ماتل (Mantel, 1967) نیز استفاده شد.

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

Origin	محل جمع‌آوری	Gene bank code	Code	نام اختصاری	طول جغرافیایی Longitude	عرض جغرافیایی Latitude	ارتفاع از سطح دریا Altitude (m)
Karaj	کرج	137	Karaj 1	کرج ۱	51°-۰۰'	35°-49'	1360
Karaj	کرج	1003	Karaj 2	کرج ۲	51°-۰۰'	35°-49'	1360
Urumie	ارومیه	1363	Urumie 1	ارومیه ۱	45°-۰۲'	32°-37'	1322
Urumie	ارومیه	1375	Urumie 2	ارومیه ۲	45°-۰۲'	32°-37'	1322
Urumie	ارومیه	1756	Urumie 3	ارومیه ۳	45°-۰۲'	32°-37'	1322
Ardebil	اردبیل	1001	Ardebil 1	اردبیل ۱	48°-18'	38°-15'	1311
Ardebil	اردبیل	20252	Ardebil 2	اردبیل ۲	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	تبریز ۱	46°-17'	38°-05'	1366
Tabriz	تبریز	20362	Tabriz 2	تبریز ۲	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	اراک ۱	49°-42'	34°-05'	1755
Arak	اراک	20314	Arak 2	اراک ۲	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

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

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.



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)

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 نمونه‌ها در پژوهش حاضر و زراعی بودن در آن آزمایش‌اش (Falahati Anbaran *et al.*, 2005).

جمعیت‌های یونجه دگرگشی و تتراپلوئیدی 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،

جدول ۲- ویژگی‌های آب و هوایی مناطق جمع‌آوری ۲۱ جمعیت یونجه (در سال‌های ۱۳۸۶-۱۳۷۷)

Table 2. Climatological characteristics of 21 *Medicago sativa* populations (during 1998-2007)

Location	محل	میانگین کمینه دما Minimum temperature (°C)	میانگین بیشینه دما Maximum temperature (°C)	میانگین ماهانه بارندگی Monthly precipitation mean (mm)	میانگین کل بارندگی Total precipitation mean (mm)
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	نیک‌شهر	20.31	34.68	5.926	71.17
Ghoochan	قوچان	6.73	19.78	28.115	337.44

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 از روش Neighbor-Joining نیز

برای تشریح الگوی تمایز، فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها براساس برآورد Unbiased فاصله ژنتیکی (Nei, 1978) در جمعیت‌های مناطق مختلف محاسبه شد. مقدار فاصله ژنتیکی از ۰/۰۱۲ بین جمعیت‌های ارومیه ۱ و ارومیه ۲ تا ۰/۲۱۸ بین جمعیت‌های اهر و کرج ۱ و ۰/۲۴۱ بین جمعیت‌های اهر و خرم‌آباد با میانگین ۰/۰۷۰ بود (جدول ۵). از فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها برای تجزیه به بردارهای اصلی (PCoA) استفاده شد. با توجه به این که که حدود ۷۳/۶۹ درصد گوناگونی در میان سه بردار اصلی قرار داشت، بنابراین این سه بردار به



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*

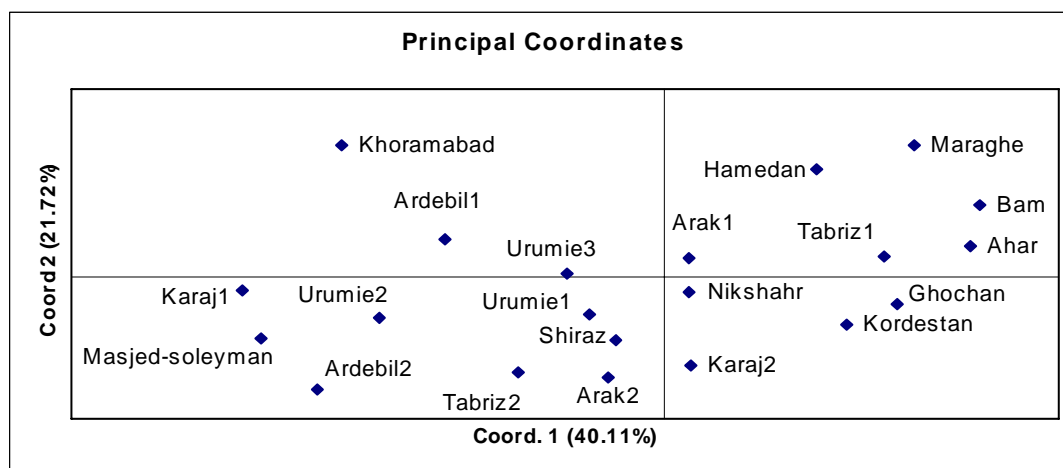
Population	جمعیت	تعداد باندها No. bands	درصد پلی مورفیسم Polymorphism %	تعداد باندهای پلی مورف نسبت به کل باندها Mean polimorphic bands over the total bands	باندهایی با فراوانی $\geq 50\%$ No. common bands $\leq 50\%$	باندهایی با فراوانی $\geq 25\%$ No. common bands $\leq 25\%$	باندهایی با فراوانی $\leq 5\%$ No. bands $\geq 5\%$
Urumie 1	ارومیه ۱	36	13.64	0.058	1	0	36
Urumie 2	ارومیه ۲	35	6.82	0.032	0	0	35
Urumie 3	ارومیه ۳	42	34.09	0.109	6	3	42
Tabriz 1	تبریز ۱	34	25.00	0.093	0	0	34
Tabriz 2	تبریز ۲	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	اردبیل ۱	38	18.18	0.069	2	0	38
Ardebil 2	اردبیل ۲	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	کرج ۱	39	6.82	0.030	3	1	39
Karaj 2	کرج ۲	37	29.55	0.127	3	1	37
Arak 1	اراک ۱	37	36.36	0.149	1	0	37
Arak 2	اراک ۲	38	22.73	0.086	3	1	38
Khoramabad	خرم‌آباد	38	22.73	0.092	5	2	38
Masjedsoleyman	مسجد سلیمان	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		

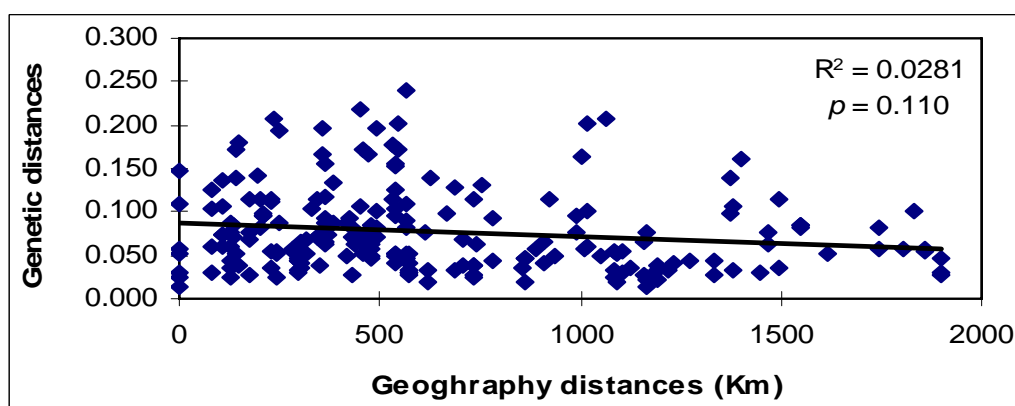
به دو کلاستر عمده تقسیم شدند (شکل ۳). در این دندروگرام جمعیت‌های خرم‌آباد و اردبیل ۱

استفاده شد (Tamura et al., 2007). در دندروگرام NJ، کلیه جمعیت‌های مورد بررسی



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

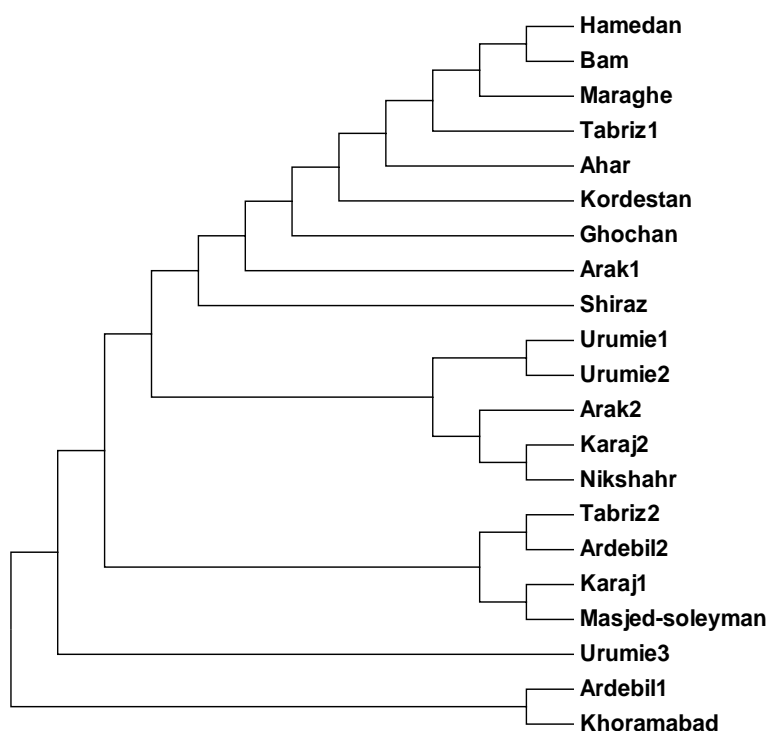
Fig.3. Scatter plot of pair-wise total protein and geographic distances of Iranian populations of *Medicago sativa*

اردبیل ۱ توسط دو بردار ۱ و ۲ از سایر جمعیت‌ها جدا شده‌اند. البته جمعیت ارومیه ۳ بر روی بردار ۲ در فاصله نزدیکی با اردبیل ۱ قرار گرفته که چنین نزدیکی در کلاستر NJ نیز قابل مشاهده است.

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

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 ( $P=0/1$ ,  $R=0/028$ ). 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

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).



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

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	0.036	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	

دریا و تعداد باندها و تعداد باندهایی که بیشتر یا منفی و معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ وجود مساوی ۵٪ فراوانی داشتند همبستگی متوسط 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 (°C)	میانگین بیشینه دما Maximum temperature (°C)	میانگین ماهانه بارندگی Mean of monthly precipitation (mm)	میانگین کل بارندگی Mean of total precipitation (mm)
No. bands	تعداد باندها	-0.473*	0.322 <sup>ns</sup>	0.288 <sup>ns</sup>	0.056 <sup>ns</sup>	0.046 <sup>ns</sup>
No. bands Freq $\geq$ 5%	میانگین تعداد باند با فراوانی $\geq$ 5٪	-0.473*	0.322 <sup>ns</sup>	0.288 <sup>ns</sup>	0.056 <sup>ns</sup>	0.046 <sup>ns</sup>
No. common bands $\leq$ 25%	میانگین تعداد باند با فراوانی $\geq$ 25٪	-0.061 <sup>ns</sup>	0.090 <sup>ns</sup>	0.185 <sup>ns</sup>	-0.057 <sup>ns</sup>	-0.060 <sup>ns</sup>
No. common bands $\leq$ 50%	میانگین تعداد باند با فراوانی $\geq$ 50٪	-0.426 <sup>ns</sup>	0.345 <sup>ns</sup>	0.364 <sup>ns</sup>	0.144 <sup>ns</sup>	0.136 <sup>ns</sup>
Mean polymorphic bands over the total bands	تعداد باندهای پلی مورف نسبت به کل باندها	0.077 <sup>ns</sup>	-0.069 <sup>ns</sup>	-0.025 <sup>ns</sup>	0.154 <sup>ns</sup>	0.157 <sup>ns</sup>
Polymorphism %	درصد پلی مورفیسم	-0.047 <sup>ns</sup>	0.092 <sup>ns</sup>	0.095 <sup>ns</sup>	-0.006 <sup>ns</sup>	-0.005 <sup>ns</sup>

ns و \* : به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطوح احتمال ۵٪.

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

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 آنجایی که وجود تنوع ژنتیکی یکی از شرایط ضروری برای موفقیت برنامه‌های

عدم وجود ارتباط بین تنوع ژنتیکی و توزیع جغرافیایی در گیاهان مختلفی گزارش شده است (Alipour et al., 2002)؛ Javid 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

آزمایش‌های تلاقی در پروژه‌های به‌نژادی  
پیشنهاد می‌شوند.

#### سپاسگزاری

پژوهش حاضر بخشی از نتایج طرح  
تحقیقاتی مصوب موسسه تحقیقات جنگل‌ها و  
مراعات کشور با عنوان بررسی تنوع ژنتیکی  
جمعیت‌های گونه‌های *Dactylis glomerata*،  
*Agropyron cristatum*، *Medicago sativa*  
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.

به‌نژادی است، می‌توان از جمعیت‌هایی که از  
تنوع و تمایز ژنتیکی 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  
کرج ۱ و ارومیه ۲ با ۶/۸۲٪ و بیشترین  
درصد پلی‌مورفیسم مربوط به جمعیت‌های  
مراغه و اهر با ۴۰/۹۱٪ بود. این جمعیت‌ها  
و نیز جمعیت‌های اهر- کرج ۱ و اهر - خرم‌آباد  
که بیشترین فاصله ژنتیکی با یک‌دیگر  
را داشتند برای ایجاد تنوع ژنتیکی و

#### 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 restriction data. *Genetics* 131: 479-491.

- Falahati Anbaran, M., Habashi, A. A., Esfehiani, M., Mohammadi, S. A., and Gharehyazi, B. 2005.** Structure and genetic diversity among and within 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 Research* 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.

- 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 agricultural 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 relationships among populations of tetraploid alfalfa, *Medicago sativa*. *Plant Breeding* 119: 311- 317.
- Mengoni, A., Ruggini, C., Vendramin, G.G., and Bazzicalupo, M. 2000b.** Chloroplast microsattellite 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 Science* 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.



- Naveed, M., Motomitsu, K., and Ghulam, M.A. 2005.** Genetic differentiation of cotton cultivars by polyacrylamide gel electrophoresis. *Central 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., Haghghi, 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 resources 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., Jenczowski, 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 castor (*Ricinus communis* L.) and some *Jatropha* 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.** Electrophoresis studing of storing proteins in yearlong *Medicago sativa*.

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 Biotechnily* 10: 8176-8187.