دانشکده علوم طبیعی
گروه زیست‌شناسی گیاهی

**پایان‌نامه**

**برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته علوم گیاهی– گرایش اکولوژی سیستماتیک**

**عنوان**

# مطالعه گونه‌های یونجه (*Medicago* L.) براساس توالی‌یابی DNA ریبوزومی هسته ناحیه ITS

**استاد راهنما**

**دکتر هوشنگ نصرتی**

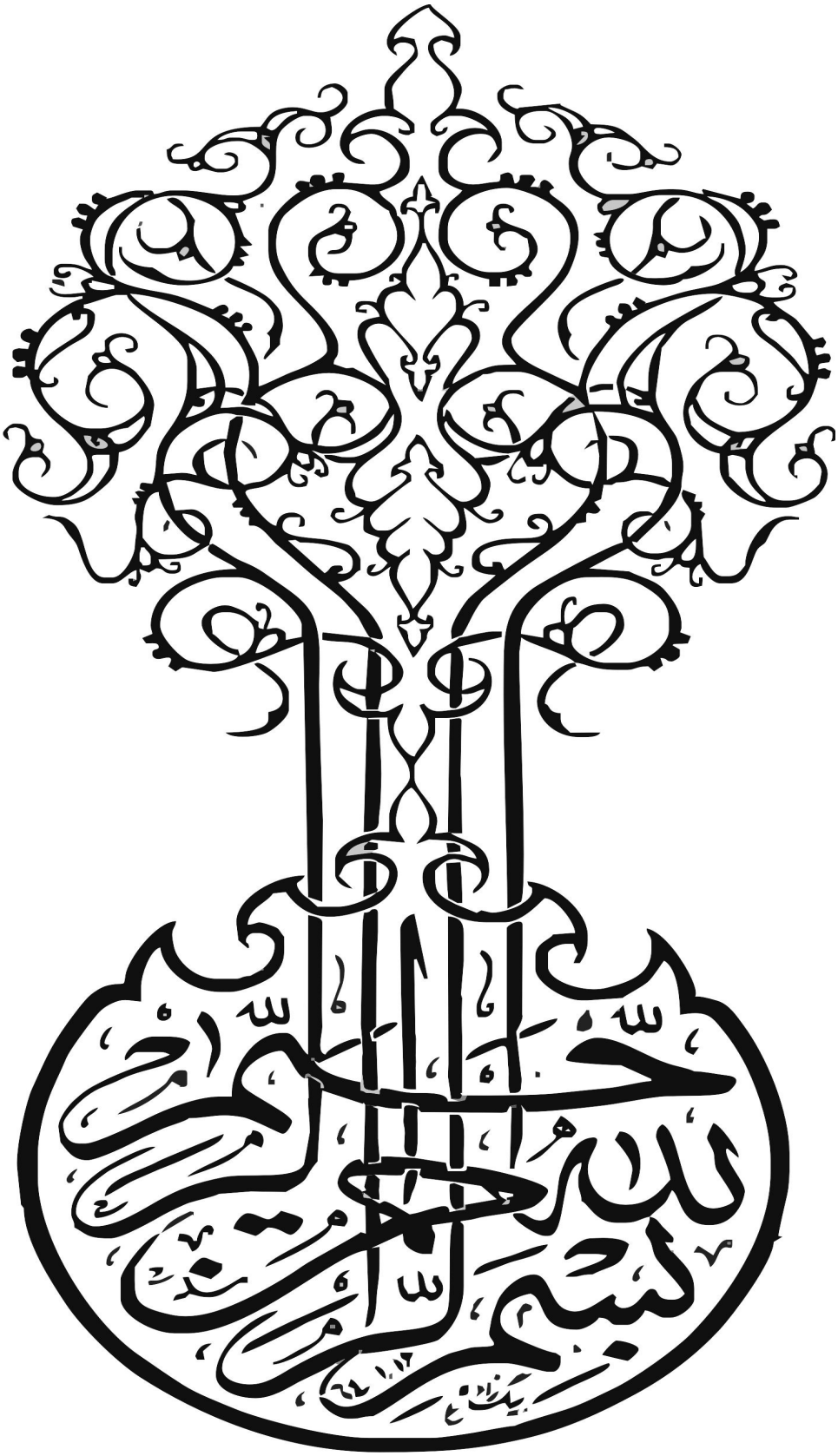
**استادان مشاور**

**دکتر محمدعلی حسین‌پور فیضی** **مهندس احمد رزبان حقیقی**

**پژوهشگر**

**لیلا روحانی**

**تیر ۱۳۹۰**


بسم الله الرحمن الرحيم

# خداوندا

تو را سپاس می گویم

و تو را می ستایم

که این کوشش به الطاف خاص تو کردم

و این رنج ها به وفای آن محبت ها که درباره ام ابراز داشتی، بردم

و از همه کسان رو به تو آوردم

و دل بر تو نهادم

و امید بر تو افکندم

و از آن لطف بی کران و نظرهای نهان که تو را بایندگان هست،

امید آن دارم

که این تلاش شمعی باشد فراراه آنان که

چون با خلقت عظیم و شگفت انگیز تو آشنا شوند

با دیدا عجاب و عظمت به حضرت تو در نگرند.

تقدیم به

# پدر و مادرم

## همه هر چه هست و نیست، از شماست

بی‌نفس شما من هیچم
اگر صدایی و نفسی هست
اگر قلب و دلی هست
از شماست

با عطر غیب شما از عطر افشانی تمام گل‌ها بی‌نیازم
نیاز من بوسیدن دست‌های سخاوتمند شماست

این کوچک عزیز
رخصت می‌خواهد در پیشگاه مهربان شما
بنشیند، زانو بزند و بگوید:
تمام آنچه که بودم، هستم و خواهم بود
همه و همه مدیون شماست

و

## خواهران و برادرانم

که در تمام مراحل زندگی مشوق و همیار من بوده‌اند.

# تشکر و قدردانی

سپاس پروردگار یکتا که نعمت آموختن را به من عطا فرمود. کسی که در تنگناهای زندگی، همواره پرتو پر مهرش را از من و خانواده‌ام دریغ ننموده است.

ذات بی‌همتایی که پرتو شمع هدایتش روشنگر زندگی همه انسانهاست، اگر...

اکنون که پایان نامه حاضر به اتمام رسید و با استعانت از درگاه پروردگار منان گامی دیگر در زندگی‌ام را پشت سر نهاده‌ام، لازم می‌دانم از زحمات کلیه اساتید و عزیزانی که در تمامی مراحل تحقیق مرا یاری نموده‌اند کمال قدردانی را به جا آورم.

از استاد گرانقدرم جناب آقای دکتر هوشنگ نصرتی که مرا از راهنمایی‌های ارزشمند و بی‌شائبه خود بهره‌مند ساختند و زحمات فراوانی در طی این دو سال برای من کشیده‌اند، نهایت تشکر و سپاس را به جای می‌آورم.

از اساتید مشاورم جناب آقای دکتر محمد علی حسین پور فیضی و آقای دکتر احمد رزبان حقیقی به خاطر زحمات و راهنمایی‌های شان تشکر می‌نمایم.

از جناب آقای دکتر علی موافقی که داوری این پایان نامه را بر عهده گرفتند، سپاسگزارم.

از استاد ارجمند جناب آقای دکتر شاهرخ کاظم پور او صالو به پاس زحمات فراوان و راهنمایی‌های ارزنده‌شان، کمال تشکر و سپاس دارم.

از دوست بسیار عزیزم خانم دکتر عاطفه امیراحمدی به خاطر راهنمایی‌های راهگشایشان و صبوری بی‌پایانشان تشکر می‌کنم.

از دوستان عزیزم در آزمایشگاه فیلوژنی مولکولی دانشگاه تربیت مدرس و همچنین از دوستانم در پژوهشکده ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری به خصوص خانم مهدیه ساشور پور کمال تشکر و قدردانی دارم.

از دوستان خوب آزمایشگاه ژنتیک و بیوشیمی، همکلاسی‌های عزیزم، هم آزمایشگاهی‌هایم، دوستان خوبم به خاطر همفکری و محبتشان و از تمام هم اتاقی‌هایم بویژه خانم مهندس حمیده رضایی که در طول دوره کارشناسی ارشد همواره همراهم بوده و روزهای سختی را با کمک آن عزیز سپری نمودم و نیز از همه کسانی که به نحوی بنده را یاری دادند و اسامی آنها در این پژوهش ذکر نگردیده است سپاسگزارم و توفیق همگان را از خداوند متعال خواستارم.

و در پایان بار دیگر از خانواده عزیزم که همواره مشوق و پشتیبان من در دوران تحصیل و پیشبرد این کار پژوهشی بودند و از هیچ کمکی دریغ ننموده‌اند از صمیم قلب تشکر می‌کنم و امیدوارم که همواره قدردان زحمات این عزیزان باشم.

| | |
|---|---|
| **نام خانوادگی دانشجو**: روحانی | **نام**: لیلا |
| **عنوان پایان‌نامه**: مطالعه گونه‌های یونجه .*Medicago* L براساس توالی‌یابی DNA ریبوزومی هسته ناحیه ITS | |
| **استاد راهنما**: دکتر هوشنگ نصرتی<br>**استادان مشاور**: دکتر محمدعلی حسین‌پور فیضی، مهندس احمد رزبان حقیقی | |

| | | |
|---|---|---|
| **مقطع تحصیلی**: کارشناسی ارشد | **رشته**: زیست‌شناسی گیاهی | **گرایش**: اکولوژی- سیستماتیک |

| | | | |
|---|---|---|---|
| **دانشگاه**: دانشگاه تبریز | **دانشکده**: دانشکده علوم طبیعی | **تاریخ فارغ التحصیلی:** ۱۳۹۰/۴/ | **تعداد صفحه**: ۶۳ |

**کلید واژه**: فیلوژنی، یونجه، DNA ریبوزومی هسته، ناحیه ITS، یک‌ساله، چندساله

**چکیده**:

در پژوهش حاضر روابط فیلوژنی و همچنین رابطه یک‌ساله و چندساله بودن بین گونه‌های جنس یونجه (Medicago- Fabaceae) با استفاده از نشانگرهای RAPD و توالی نوکلئوتیدی ناحیه nrDNA ITS هسته مورد مطالعه قرار گرفت که در آن گونه .*Trifolium pratens* L به عنوان برون‌گروه انتخاب شد. نتایج حاصله نشان می‌دهد که در درخت فیلوژنی گونه چندساله یونجه (.*M. sativa* L) در میان گونه‌های یک‌ساله جای گرفت، نشان‌دهنده این است که در یک جنس گونه‌های یک‌ساله همیشه از چندساله حاصل نمی‌شوند، بلکه دو حالت مذکور می‌توانند به طور متناوب از همدیگر تحول یابند.

## فهرست مطالب

مقدمه ..... ۱
فصل اول: بررسی منابع ..... ۴
۱-۱- تاریخچه و خاستگاه یونجه ..... ۴
۱-۲- اهمیت یونجه ..... ۵
۱-۳- گیاه‌شناسی یونجه ..... ۷
۱-۴- مورفولوژی گونه‌های یونجه ..... ۹
۱-۵- مطالعه روابط تکاملی و فیلوژنی ..... ۱۰
۱-۶- برخی از توالی‌های ژنی مورد استفاده در سیستماتیک مولکولی ..... ۱۴
۱-۶-۱- توالی‌های DNA کلروپلاستی ..... ۱۵
۱-۶-۲- توالی‌های DNA هسته‌ای ..... ۱۶
۱-۷- روش‌های مطالعه nrDNA ..... ۲۱
۱-۸- کاربرد توالی nrDNA ITS در مطالعات تاکسونومی ..... ۲۳
۱-۹- روش‌های تجزیه و تحلیل آماری در مطالعات فیلوژنتیکی ..... ۲۸
۱-۹-۱- روش ماکزیمم پارسیمونی (بیشینه صرفه جویی) ..... ۲۸
۱-۹-۲- روش ماکزیمم احتمال ..... ۲۹
۱-۹-۳- روش Bayesian ..... ۲۹
۱-۱۰- هدف پژوهش ..... ۳۰
فصل دوم: مواد و روش‌ها ..... ۳۱
۲-۱- تهیه نمونه‌های گیاهی ..... ۳۱
۲-۲- خیساندن بذرهای گیاهی ..... ۳۲
۲-۳- استخراج DNA ..... ۳۲
۲-۴- تعیین کیفیت و کمیت DNA ..... ۳۴
۲-۴-۱- تعیین کیفیت و کمیت DNA با استفاده از روش اسپکتوفتومتری ..... ۳۴
۲-۴-۲- تعیین کیفیت و کمیت DNA با استفاد از الکتروفورز ژل آگارز ..... ۳۵
۲-۵- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ..... ۳۵
۲-۵-۱- دستور العمل یک واکنش استاندارد PCR ..... ۳۵

۲-۵-۲- مراحل اصلی یک برنامه PCR ..... ۳۶
۲-۵-۳- برنامه دمایی برای تکثیر قطعات nrDNA ITS ..... ۳۷
۲-۶- الکتروفورز محصولات PCR ..... ۳۷
۲-۷- آشکار سازی نوارهای الکتروفورز ..... ۳۹
۲-۸- تعیین توالی مناطق تکثیر شده ..... ۳۹
۲-۹- آنالیز فیلوژنی ..... ۳۹
۲-۱۰- نشانگر RAPD ..... ۴۰
۲-۱۱- برآورد فاصله ژنتیکی ..... ۴۱
۲-۱۲- روش Neibour Joining ..... ۴۲
فصل سوم: نتایج و بحث ..... ۴۳
۳-۱- تعیین توالی مناطق تکثیر شده ..... ۴۳
۳-۲- آنالیز کلادیستیک داده‌های مولکولی nrDNA ITS ..... ۴۴
۳-۲-۱- توالی‌های هم‌ردیف‌سازی شده با برنامه ClustalX ..... ۴۵
۳-۳- نشانگر RAPD ..... ۴۵
۳-۴- برآورد فاصله ژنتیکی میان گونه‌های یونجه ..... ۴۶
۳-۵- بحث و نتیجه‌گیری ..... ۵۰
۳-۶- پیشنهادات ..... ۵۲
منابع ..... ۵۳
پیوست ۱: توالی‌های همردیف شده ۶ تاکسون مورد مطالعه با برنامه ClustalX ..... ۶۰

## فهرست شکل‌ها

شکل ۱-۱. مورفولوژی گیاه *Medicago sativa* L. ۱۱

شکل ۱-۲. توالی DNA کلروپلاستی دو منطقه غیر کد شونده اینترون trnL و فاصله‌گر بین ژنی trnL-trnF. جهت و موقعیت آغازگرها نشان داده شده است (بر گرفته از Quandt et al., 2004). ۱۶

شکل ۱-۳. DNA ریبوزومی ۱۷

شکل ۱-۴. نواحی DNA ریبوزومی هسته ۱۹

شکل ۱-۵. ناحیه فاصله‌گر رونویسی شونده داخلی (nrDNAITS). زیر واحدها، جهت و موقعیت آغازگرها نشان داده شده است (با تغییر از Soltis et al., 1998) ۲۰

شکل ۳-۱. محصولات PCR شده ناحیه nrDNA ITS بر روی ژل آگارز ۴۳

شکل ۳-۲. کروماتوگرام ناحیه nrDNA ITS پنج گونه از جنس Medicago L. ۴۴

شکل ۳-۳. الگوی نواربندی آغازگر RAPD N4 ۴۶

شکل ۳-۴. درخت فیلوژنی حاصل از آنالیز آغازگر RAPD با استفاده از نرم‌افزار Statistical 5 و روش Single Linkage ۴۸

شکل ۳-۵. درخت فیلوژنی حاصل از آنالیز nrDNA ITS با استفاده از نرم‌افزار Mega 4 و روش NJ (Neighbour Joining) مدل ماکزیمم احتمال (Maximum Likelihood). ۵۰

## فهرست جدول

جدول ۲-۱. مشخصات نمونه‌های مورد مطالعه ۳۲

جدول ۲-۲. رده‌بندی مورفولوژیکی گونه‌های مطالعه شده با استفاده از فلور ایرانیکا ۳۲

جدول ۲-۳. ترکیبات بافر استخراج در حجم نهایی ۱۰۰ میلی لیتر و PH ≈ ۷-۸ ۳۴

جدول ۲-۴. توالی آغازگرهای استفاده شده برای تکثیر و تعیین توالی قطعات nrDNA ITS ۳۵

جدول ۲-۵. ترکیبات به کار رفته در یک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استاندارد ۳۶

جدول ۲-۶. اجزای بافر TAE در حجم نهایی ۱۰۰ میلی لیتر و PH = ۸ ۳۸

جدول ۲-۷. جدول ۳-۱. توالی آغازگر استفاده شده برای واکنش RAPD-PCR ۴۰

جدول ۳-۱. ماتریس فاصله ژنتیکی میان گونه‌های یونجه براساس آغازگر RAPD با استفاده از روش فاصله اکلیدوسی (Euclidean distances) ۴۷

جدول ۳-۲. ماتریس فاصله ژنتیکی میان گونه‌های یونجه بر اساس آغازگر nrDNA ITS روش p-distance ۴۹

## مقدمه

بررسی روابط تکاملی و فیلوژنی در گیاهان، از طریق صفات مورفولوژیکی همواره متداول بوده است. گیاهان براساس ویژگی‌های موفولوژیک متمایزکننده شناسایی می‌شوند (Du1 *et al*., 2006). در بعضی موارد شناسایی گونه‌های گیاهی براساس صفات موفولوژیک مشکل و دارای محدودیت است. در مواردی نشانگرها و صفات مورفولوژیک به علت تاثیرپذیری از محیط کارایی کمی در شناسایی و رده‌بندی گونه‌ها دارند (Shen *et al*., 1998).

در سال‌های اخیر از روش‌های مولکولی برای مطالعات پایه‌ای و کاربردی در انسان، حیوان و گیاه استفاده شده است، به طوری که کشف انواع مختلفی از نشانگرها باعث پیشرفت عمده‌ای در مطالعات سیستماتیکی گردیده است (Flavell, 1980). روش‌های مولکولی ابزارهای بسیار مهم و قوی در ارزیابی روابط خویشاوندی، ارزیابی تنوع ژنتیکی و شناسایی گونه‌های جمعیت‌های گیاهی مختلف می‌باشند. این روش‌ها به دو دسته تقسیم می‌شوند: روش‌هایی که در آنها از نشانگرهای مولکولی استفاده می‌شود و نوع دیگر آن روش‌هایی هستند که بر پایه توالی‌های ژنی می‌باشند (Williams *et al*., 1990; Innis *et al*., 1990).

داده‌های مولکولی مبتنی بر توالی‌های ژنی انقلاب بزرگی را در اواخر ۱۹۸۰ در تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی ایجاد کردند. در گیاهان اکثریت تعیین توالی‌ها براساس مطالعات فیلوژنتیک مولکولی به خصوص در سال‌های اخیر صرفا براساس DNA ژنومی (DNA ریبوزومی هسته- nrDNA[1]) و کلروپلاستی (cpDNA[2]) هستند (Alvaerz *et al*., 2003; Small *et al*., 2004).

DNA ریبوزومی هسته توالی‌های کدکننده RNA ریبوزومی می‌باشند که در هستک سازمان یافته‌اند. این ژن هسته‌ای یک توالی تکراری با تعداد کپی ۵۰۰ تا بیش از ۴۰۰۰۰ در ژنوم است که در تکرارهای پشت سر هم آرایش یافته است به طوری که در گیاهان ده درصد کل DNA را تشکیل داده است (Long *et al*., 1980; Hillis *et al*., 1991; Buchler *et al*., 1996; Rogers *et al*., 1987).

[1] Nuclear ribosomal DNA
[2] Chloroplast DNA

بررسی‌ها نشان می‌دهد که از ۲۴۴ مقاله منتشر شده درمورد روابط فیلوژنتیکی در طی سال‌های ۱۹۹۸ تا ۲۰۰۳، ۶۶٪ مربوط به ITS[1] می‌باشد (Alvaerz *et al.*, 2003). بنابراین یکی از مهم‌ترین توالی‌های مولکولی برای مطالعات فیلوژنتیکی در سطوح جنس و درون جنس ناحیه ITS ژن‌های DNA ۱۸S-۵.۸S-۲۶S ریبوزومی هسته می‌باشد (Feliner *et al.*, 2007).

جنس یونجه (*Medicago* L.) یکی از مهم‌ترین نیام‌داران علوفه‌ای دنیا و اولین گیاه علوفه‌ای اهلی شده می‌باشد که بومی نواحی مدیترانه‌ای است (Miller, 1984). یونجه در مناطق مختلف جهان از انتشار جغرافیایی بسیار وسیعی برخوردار است. خاستگاه اصلی این جنس به لحاظ جغرافیایی قفقاز، شمال غربی ایران، ارتفاعات ترکمنستان و شمال شرقی ترکیه است (Hanson, 1988). یونجه به راسته گل‌سرخیان (Rosales)، تیره حبوبات (Fabaceae)، طایفه سه‌برگچه‌ای‌ها (Trifolieae) تعلق دارد (Cronquist, 1989). تیره حبوبات از جمله بزرگترین تیره گیاهان گلدار می‌باشد (Wojciechow ski *et al.*, 2004; Lewis *et al.*, 2005). جنس یونجه ۸۳ گونه دارد که ۵۵ گونه آن یکساله و ۲۷ گونه آن چندساله هستند (Steele *et al.*, 2010). گونه‌های چندساله معمولا عمدتا دگرگرده‌افشان و تتراپلوئید (۲n=۴x=۳۲) و گونه‌های یک‌ساله خودگرده‌افشان و دیپلوئید (۲n=۲x=۱۶) هستند (Quiros *et al.*, 1988). یونجه در بین گیاهان علوفه‌ای از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد و بنا به دلایلی به ملکه گیاهان علوفه‌ای شهرت یافته است. همزیستی یونجه با باکتری‌های ریزوبیوم و در نتیجه تثبیت نیتروژن مولکولی در این گیاه، اهمیت آن را برای تناوب با محصولات زراعی برای حاصلخیزی خاک زیادتر کرده است به طوری که در کشاورزی پایدار می‌تواند نقش اساسی داشته باشد (De-Haan *et al.*, 1998).

با توجه به جنبه‌های مثبت این گونه از نظر تولید علوفه، حفاظت خاک، تناوب زراعی، تثبیت بیولوژیک ازت، کود سبز، دارا بودن مواد مغذی و خواص دارویی (Hanson, 1988)، شناسایی این گونه حائز اهمیت می‌باشد. همچنین آگاهی از شناسایی و رده‌بندی گونه‌های یونجه و میزان تنوع ژنتیکی

[1] Internal transcribed spacer

گونه‌های آن در اصلاح نباتات از اهمیت خاصی برخوردار است خصوصا برای تولید ارقام اصلاح شده مهم می‌باشد.

Bena و همکاران (a ۱۹۹۸) در یک تحقیق جامع، فیلوژنی جنس یونجه را با استفاده از نشانگرهای مولکولی ITS و ETS[1] مورد بررسی قرار داده‌اند. براساس نتایج این تحقیق، گونه‌های چندساله و دگرلقاح برخلاف نظر سایر محققین مانند Lesins (۱۹۷۹)، ابتدایی نبوده و به نظر می‌رسد در مسیر تکاملی ابتدا گونه‌های یک‌ساله خودلقاح و سپس گونه‌های چندساله دگرلقاح تشکیل شده باشد. همچنین در سال ۱۹۹۸، این محققین (Bena و همکاران در سال b ۱۹۹۸) در پژوهش دیگری عنوان کرده بودند که نتایج فیلوژنی مولکولی حاصل از نشانگرهای ITS و ETS، حاکی از تعلق داشتن گونه *M. radiata* L. به جنس یونجه (*Medicago*) می‌باشد در حالی‌که Small در سال ۱۹۸۰ نظریه نزدیکی این گونه را به جنس *Trigonella* مطرح کرده است و نیز گاهی بیان شده است این گونه حدواسط دو جنس فوق می‌باشد. Bena و همکاران (۱۹۹۸) بیان کرده‌اند که تناقض‌هایی بین مطالعات فیلوژنی مولکولی و رده‌بندی کلاسیک مورفولوژیک در جنس یونجه وجود دارد که باید این مشکل حل شود.

در این پروژه ۵ گونه از جنس یونجه (*Medicago* L.): یک گونه چندساله (*M. sativa* L.) و چهار گونه یک‌ساله (*M. orbicularis* L., *M. radiata* L., *M. scutellata* L., *M. minima* L.) در سطح DNA با استفاده از توالی‌یابی DNA ریبوزومی هسته‌ای ناحیه ITS مطالعه شدند. همچنین به منظور حصول اطمینان از نتایج به دست آمده، یک بار دیگر آزمایشات با نشانگرهای RAPD تکرار شد که از میان ۴ آغازگر استفاده شده فقط الگوهای نواربندی یک آغازگر (N4) مناسب و قابل امتیازدهی بود.

[1] External transcribed spacer

# فصل اول

# بررسی منابع

# فصل اول: بررسی منابع

## ۱-۱- تاریخچه و خاستگاه یونجه

تاریخچه یونجه (*Medicago* L.)، سرگذشت مهم‌ترین گیاه علوفه‌ای دنیا و اولین گیاه علوفه‌ای اهلی‌شده در دنیاست که بشر اولیه آن را به درستی به عنوان یک گیاه با ارزش از لحاظ تغذیه دام تشخیص داده است (کریمی، ۱۳۶۹؛ Small, 2010). قدمت کشف این گیاه به سال‌ها قبل از میلاد مسیح و به ابتدای تاریخ تمدن می‌رسد. قدیمی‌ترین منابع برای شناسایی تاریخچه یونجه به عنوان علوفه به ۳۳۰۰ سال پیش در فارس و ترکیه برمی‌گردد. تاریخ کاشت یونجه در ایران به مادها و هخامنشی‌ها می‌رسد. از یافته‌های تاریخی چنین برمی‌آید که یونجه در سرزمین مادها (کوه‌های شمال غرب ایران) در هزاره قبل از میلاد توزیع گسترده‌ای داشته است و از این رو رومی‌ها یونجه را علف مادها نامیدند (Sinskaya, 1950). یونجه معمولی (*M. sativa* L.) برای اولین بار در ایران کاشته می‌شده و در قرن هشتم از طریق مسلمانان به شمال آفریقا و اسپانیا وارد شده است و آن را آلفا آلفا[1] به معنی بهترین علوفه نامیدند (Klinkowski, 1933). مبدا اصلی یونجه را خاور نزدیک و آسیای مرکزی باید دانست؛ بنابر نظر وایلوف دانشمند روسی، مبدا یونجه مرکز خاور نزدیک، آسیای صغیر، قفقاز، ایران و مناطق کوهستانی ترکمنستان روسیه است (Hanson, 1988). یونجه از مدتها پیش در کشور ایران کشت می‌شده است و هم اکنون نیز به طور وحشی از چین تا اسپانیا و از سوئد تا آفریقای شمالی رشد می‌یابد. به علاوه این گیاه به طور گسترده‌ای در جنوب آفریقا، استرالیا، نیوزلند و شمال و جنوب آمریکا با محیط جدید سازگاری یافته است (Bolton, 1972; Henry, 1923).

این گیاه در منطقه‌ای که دارای آب و هوای قاره‌ای سرد یا تابستان‌های گرم و خشک است، رشد و گسترش یافته است. یک بهار دیررس و تابستان‌های کوتاه از مشخصات آب و هوایی قاره‌ای است، با

[1] Alfalfa

توجه به این خصوصیات آب و هوایی، منطقه سازش یونجه در کشور ایران شامل نواحی سردسیر یا مناطق غربی کشور می‌باشد. سینسیکا با مطالعات وسیع فیلوژنتیک بر روی گیاهان تیره حبوبات و یونجه خصوصا در روسیه از لحاظ مبدا دو مرکز برای این گیاه مشخص کرده است. اولین مرکز یونجه را ناحیه کوهستانی قفقاز می‌داند که ارقام جدید یونجه‌های اروپایی از آنجا به‌دست آمده است. این دانشمند معتقد بود که مناطق کوهستانی قفقاز و آسیای صغیر و نیز نواحی شمال غرب ایران مرکز اولیه و مبدا یونجه است. با توجه به این که این مناطق با زمستان‌های سخت و آب و هوای قاره‌ای مشخص می‌شوند، بنابراین ارقام یونجه به‌دست آمده از این مناطق دارای مقاومت به سرمای سخت زمستان است. دومین مرکز مستقل یونجه از نظر این دانشمند آسیای مرکزی می‌باشد و وی اظهار داشت رفتار یونجه‌های آسیای مرکزی در مقایسه با آن‌هایی که در بخش اروپایی روسیه و یا آن‌هایی که در شرایط آب و هوایی اروپا سازگار یافته‌اند، متفاوت است (کریمی، ۱۳۶۹).

## ۱-۲- اهمیت یونجه

همان‌طور که قبلاً اشاره شد، یونجه از مهم‌ترین گیاهان علوفه‌ای است و در بین گیاهان علوفه‌ای از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد و بنا به دلایلی به ملکه نباتات علوفه‌ای شهرت یافته است (Miller, 1984). از وسعت و پراکندگی آن می‌توان نتیجه گرفت که این گیاه قابلیت محصول‌دهی بالا را در دامنه وسیعی از نظر خاک و شرایط اقلیمی دارا می‌باشد و حتی در شرایط سخت آب و هوایی می‌تواند علوفه‌ای با کیفیت بالا تولید کند (حیدری شریف آباد، ۱۳۷۹). سازش قابل توجه یونجه در ایران را بایستی به بومی بودن و سازگاری آن با شرایط مناسب آب و هوایی و خاکی کشور دانست. طبق گزارشات مختلف بیشتر خاک‌های ایران آهکی بوده و به دلیل داشتن کلسیم و منیزیم مورد نیاز یونجه برای زراعت آن مساعد می‌باشد. این خاک‌ها در عین حال pH مناسب برای زراعت یونجه را نیز دارا هستند. pH مناسب خاک برای کشت یونجه در حدود ۷ است (کریمی، ۱۳۷۹). از نظر کیفیت علوفه و مواد غذایی و میزان انرژی، مطلوب و از گیاهان بسیار خوش‌خوراک بوده و در تغذیه دام‌ها

موثر می‌باشد (Cocks, 1992). همچنین منبع بسیار خوبی جهت تولید شهد و پرورش زنبور عسل است. علاوه بر آن از برگ یونجه مواد شیمیایی استخراج می‌شود که در صنعت و داروسازی مصرف می‌گردد (Hanson, 1988). سرشار از انواع ویتامنی‌ها (به‌خصوص ویتامین‌های A، E، C و K) و ترکیب‌های معدنی (از قبیل کلسیم) بوده و به دلیل داشتن ترکیب‌های کلسیم‌دار و مواد نیتروژن‌دار و ویتامین‌ها در جیره غذایی دام‌ها حائز اهمیت است و جهت جلوگیری از بیماری راشیتیسم و استحکام استخوان‌بندی، به ویژه در دام‌های جوان مفید می‌باشد (مظفریان، ۱۳۷۹؛ زرگری، ۱۳۷۰). ارزش یونجه تنها در ذخیره نمودن مواد غذایی آن نبوده، بلکه از راه تهویه زمین، تناوب، زهکشی، افزایش مواد عالی خاک و ازدیاد نیتروژن خاک تاثیر مهمی در اصلاح زمین زراعی دارد (حیدری شریف آباد، ۱۳۸۰).

احتمالا موفقیت اصلی این گیاه را می‌توان در سیستم ریشه‌ای آن دانست. همزیستی بین ریشه یونجه با باکتری‌های ریزوبیوم و در نتیجه تثبیت نیتروژن مولکولی در این گیاه، اهمیت آن را برای تناوب با محصولات زراعی برای حاصلخیزی خاک زیادتر کرده است به طوری که در کشاورزی پایدار می‌تواند نقش اساسی داشته باشد. به علاوه، یونجه به دلیل داشتن ریشه عمیق و راست، توانایی کسب رطوبت قابل جذب را از اعماق زمین (تا عمق ۵ متر و بیشتر) دارد. این امتیاز، امکان نجات گیاه از خطر طولانی بودن خشکی را فراهم می‌سازد. همچنین برای گیاه یونجه این امکان وجود دارد که در شرایط خشکی و سرما به حالت رکورد و خفتن درآمده، بار دیگر به رشد و نمو خود ادامه دهد. ساقه‌های خزنده روی زمین یا استولون، ریشه‌های خزنده زیر زمین یا ریزوم، و طوقه به خاک نشسته یونجه، مقاومت این گیاه را در مقابل سرمای سخت زمستان و یخبندان افزایش می‌دهد و ادامه حیات یونجه را در برابر عوامل فوق تضمین می‌کند (De-Haan *et al.*, 1998). یونجه‌های چندساله از پرسودترین گیاهان هستند و دارای عمر طولانی می‌باشند به طوری که برخی از واریته‌های آن می‌توانند بیش از ۱۳ سال به طور مستمر محصول تولید کنند (نامدار و همکاران، ۱۳۴۶).

یونجه گیاهی گرمادوست است و بهترین رشد و نمو را در مناطقی خواهد داشت که از شرایطی خشک، آفتابی و گرم برخوردار باشد (Moynihan *et al.*, 1996). یونجه در مقابل تغییرات دمایی محیط حساسیت زیادی ندارد و در این رابطه گزارش شده است که گونه‌های این گیاه از قدرت تحمل دماهای ۶۰-۵۰ درجه سانتی‌گراد زیر صفر و همچنین ۵۰ درجه سانتی‌گراد بالای صفر را بدون صدمه دیدن برخوردار می‌باشند. کشت یونجه همچنین در ارتفاعات مختلف نیز مقدور است به طوری که در ارتفاع ۱۸۹۰ متری در همدان یا در ارتفاع ۳ متری از سطح دریا در بعضی مناطق کم ارتفاع مانند آبادان و یا پایین‌تر از سطح دریا مثل هلند و یا در ارتفاع ۲۴۰۰ متری کشت و کار یونجه امکان‌پذیر است. ریشه این گیاه به اکسیژن نسبتا زیادی نیاز دارد. این گیاه در مرحله جوانه زنی به شوری خاک حساس است ولی بعد از آن سازگاری ویژه‌ای را نسبت به شوری خاک نشان می‌دهد. یونجه در زمین‌های بیش از حد اسیدی که کمبود آهک داشته باشند، عملکرد چندان رضایت بخشی نخواهد داشت. بنابراین یونجه را برای خاک‌های شور نسبتا مناسب و برای خاک‌های اسیدی نامطلوب می‌توان تلقی کرد. یونجه زمین‌های خشک را به زمین‌های بیش از حد مرطوب ترجیح می‌دهد و در صورتی که طبقه تحت الارضی بیش از حد مرطوب نباشد و سایر مواظبت‌های اولیه در حین رشد انجام شود، ۶-۷ سال و بیشتر (حتی تا ۳۰ سال) زمین زیر کشت قادر به بهره‌برداری است (Gillespie, 1989).

## ۱-۳- گیاه‌شناسی یونجه

مطابق با طبقه‌بندی Cronquist (۱۹۸۹)، جنس یونجه (*Medicago* L.) متعلق به تیره Fabaceae می‌باشد. در زیر، طبقه‌بندی جنس یونجه (*Medicago* L.) براساس طبقه‌بندی Cronquist از سطح شاخه تا طایفه آورده شده است.

| | | |
|---|---|---|
| شاخه | Division | Magnoliophyta |
| رده | Class | Magnoliopsida |
| زیررده | Subclass | Rosidae |
| راسته | Order | Fabales |
| تیره | Family | Fabaceae |
| طایفه | Tribe | Trifolieae |
| جنس | Genus | Medicago |

تیره حبوبات (Fabaceae) با داشتن حدود ۷۳۰ جنس و ۱۹۴۰۰ گونه، سومین تیره گیاهان نهاندانه و دومین تیره از نظر کشاورزی و اقتصادی بعد از تیره گندمیان است. این تیره متشکل از گیاهان علفی یک‌ساله و چندساله تا درختان بلند می‌باشد که در مناطق معتدل تا حاره‌ای پراکنش دارند و به دلیل داشتن متابولیسم تثبیت نیتروژن در گرهک‌های ریشه که حاوی باکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن هستند به زیستگاه‌های نیمه خشک تمایل دارند (Wojciechow ski *et al*., 2004; Lewis *et al*., 2005). از نظر ریخت شناسی گیاهان این تیره دارای برگ‌های ساده تا مرکب می‌باشند. گل‌ها نامنظم، دوجنسی با تخمدان زبرین هستند که در گل‌آذین خوشه یا سنبله یا کپه‌ای قرار دارند (Polhill, 1994). به جز چند استثنا در همه تاکسون‌ها نیام‌ها تک‌خانه‌ای، با تمکن جداری در طول درز پشتی، با دو تا تعداد زیادی تخمک که در دو ردیف متناوب در محل جفت قرار می‌گیرند و در طول یک یا دو درز باز می‌شوند، گاهی دارای بخش‌های تک‌دانه‌ای بهم‌فشرده (لومن) و یا ناشکوفا می‌باشند. بررسی‌های فیلوژنی مولکولی براساس توالی‌های کلروپلاستی (Doyle *et al*., 2000)، اینترون trnL (Penington *et al*., 2001) و matK (Wojciechowski *et al*., 2004) نشان می‌دهند که تیره حبوبات (Fabaceae) گروه تک تباری[1] را تشکیل می‌دهد (Lewis *et al*., 2005).

جنس یونجه (*Medicago* L.) شامل ۸۳ گونه است که ۵۵ گونه آن یک‌ساله و ۲۷ گونه آن چندساله هستند (Steele *et al*., 2010). عدد پایه کروموزومی در این جنس ۸ و در برخی موارد ۷ است. سه سطح پلوئیدی دیپلوئید (۲n=2x=۱۴، ۲n=2x=۱۶)، تتراپلوئید (۲n=4x=۳۲) و هگزاپلوئید

[1] Monophyletic

(۲n=۶x=۴۸) در این جنس دیده می‌شود (Quiros *et al*., 1988). گونه‌های چندساله، دگرگرده‌افشان و گونه‌های یک‌ساله، خودگرده‌افشان می‌باشند، همچنین درجات متفاوتی از خودناسازگاری در آنها یافت می‌شود که خودناسازگاری یونجه از نوع گامتوفیتی است. گونه‌های یک‌ساله و چندساله نمی‌توانند با هم تلاقی داشته باشند. یونجه زراعی اتوتتراپلوئید بود و دارای سیستم تفکیک ژنی پیچیده‌تری نسبت به گونه‌های دیپلوئید می‌باشد (Tanksley *et al*., 1983). اکثر گونه‌های چندساله تتراپلوئید (۲n=۴x=۳۲) بوده ولی گونه‌های یک‌ساله دیپلوئید (۲n=۲x=۱۶) می‌باشند (Diwan *et al*., 1997).

## ۱-۴- مورفولوژی گونه‌های یونجه

گونه‌های یونجه، یک‌ساله یا چندساله، علوفه‌ای با ریشه‌ای راست، مستقیم، عمیق و ضخیم که همان ریشه اولیه گیاه است و از آن تعداد زیادی انشعابات جانبی پدید می‌آید، می‌باشند. غده‌های باکتری بر روی ریشه‌های ظریف به طور منفرد قرار می‌گیرند و شکل استوانه‌ای و باریک و نازک دارد. به موازات پیدایش ریشه اولیه قسمت زیرلپه یا هیپوکوتیل در زیر خاک قرار می‌گیرد و به تدریج از سطح خاک بیرون می‌آید. یونجه جوانه‌زده دارای دولپه است که به صورت برگ‌های متورم به نظر می‌رسد. پس از مدتی این لپه‌ها از بین رفته و از میان آنها اولین برگ یا دمبرگ بلندی تولید می‌شود که قلبی‌شکل است و پس از چندی نخستین برگ مرکب سه‌برگچه‌ای به وجود می‌آید. یونجه سیستم ریشه‌ای قوی دارد که در مقاومت به کلیه عوامل نامساعد و استفاده از مواد غذایی خاک به گیاه کمک می‌کند. ساقه یونجه در نزدیک سطح زمین تولید انشعابات بسیار زیاد و ظریفی می‌نماید که هر کدام برگ‌های مرکب زیادی در بر دارد. این انشعابات به مرور زمان چوبی و ضخیم می‌شوند و به یک طوقه تبدیل می‌گردد بعدها از این محل ساقه‌های کوتاه منشعب و ضخیم تولید می‌گردد که تبدیل به ساقه‌های بلند و اصلی یونجه می‌شود. تعداد ساقه‌های یونجه بین ۵ تا ۲۵ عدد (بسته به نوع گونه ممکن است متفاوت باشد) می‌باشد که از هر ساقه، ساقه دیگری بعد از چیدن یا رسیدن تولید