بسم الله الرحمن الرحيم

٤٦١١١

دانشگاه مازندران
مجتمع آموزش عالی علوم کشاورزی و منابع طبیعی
دانشکده علوم زراعی

بررسی تولید بذر مصنوعی یونجه (*Medicago sativa L.*)

جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی

اساتید راهنما

دکتر سید کمال کاظمی تبار

دکتر سید مجتبی خیام نکویی

استاد مشاور:

مهندس مرتضی ابراهیمی

نگارش

عاطفه پزشکی نجف‌آبادی

۱۳۸۷ /۳/ ۲۳

زمستان ۱۳۸۵

۴۶۱۱۱

تقدیر و تشکر

پروردگارا اینک که بار دیگر به مدد تو توانستم مرحله دیگری از کمال و ترقی را طی کنم تو را سپاس می گویم؛ به خاطر تمام لطفها و مرحمتهایی که در حق بنده ناچیزت کردی. خاضعانه بـه کمـال ذات تو اقرار می کنم که با تمام غرور کذب خود دربرابرقدرت لایزال تو ذره بیش نیستم و ایـن بزرگتـرین درسی بود که در کلاس تو آموختم. لطف و مرحمت تو بود که از طریق مساعدتهای مـادی و معنـوی مرا یاری کرد تا بتوانم دست پر ازا ین کلاس بیرون بیایم . و اگر تو نمی خواستی من هرگز بـه اینجـا نمی رسیدم. خدای مهربانم، دست پر مهر تو را در دستهای پرمهر بنـدگانت بـا تمـام وجـود احسـاس کردم و بر خود لازم و واجب می دانم که از تمام کسانی که معلم و یاور من در این کلاس بودند کمال تشکر را داشته باشم؛ هر چند می دانم در این امر بسیار ناتوان خواهم بود، همـانطور کـه در شـکر تـو ناتوانم.

در ابتدای راه از اساتید راهنمای خود آقایان دکتر سید کمال کاظمی تبار و دکتر مجتبی خیام نکویی که در شروع و پایان پروژه چه در دانشگاه و چه در پژوهشـکده بیوتکنولـوژی مـرا پشـتیبانی و یـاری کردند و امکانات لازم را در اختیارم قرار دادند کمال تشـکر و سـپاس را ادا نمـایم . در ادامـه از آقـای مهندس مرتضی ابراهیمی، مشاور گرامـی ام ، کـه هماننـد معلمـی دلسـوز در لحظـه لحظـه ایـن راه راهنمایی ام کردندخالصانه تشکرو قدردانی کنم . اگر کمکهای فراوان و بی شائبه ایشان نبود من هرگز موفق به طی این مرحله نبودم. می دانم برای ابد، همیشه شـرمنده ایشـان خـواهم بـود. همچنـین از تمامی کادر صمیمی آزمایشگاه کشت بافت، خانمها، مهندس بشـارتی فـر، طـراوت، معینـی و تمـامی اساتید و کارکنان خوب پژوهشکده بیوتکنولـوژی اصـفهان کـه در ایـن راه مـرا یـاری کردنـد، بسـیار متشکرم.

علاوه بر این از تمامی استادان عزیزم بسیار سپاسگزارم که هر چه هسـتم و هـر چـه دارم از آنهاسـت. لازم می دانم در اینجا از تمامی همکلاسیها و دوستان خوبم که مشفق من در این راه بودند و نام آنهـا در این مقوله نمی گنجد کمال تشـکر و قـدردانی را داشـته باشـم. امیـدوارم بتـوانم جوابگـوی تمـام محبتهای شما عزیزان باشم.

با تشکر، شاگرد شما : عاطفه پزشکی نجف آبادی.

تقدیم به تمام کسانی که

دوستشان دارم.

چکیده:

یونجه(*Medicago sativa*) یکی از مهمترین گیاهان علوفه‌ای جهان است که نقش بسیار مهمی در تامین علوفه دارد. این گیاه خودناسازگار و دگرگشن بوده و به لحاظ خصوصیات اتوتتراپلوئیدی در فرایند تقسیم میوز با مشکل مواجه می‌باشد. از این رو روش‌های مرسوم اصلاحی برای تولید ارقام پرمحصول، در یونجه کارایی چندانی ندارد. در بین گونه‌های وحشی و نیز در مزارع یونجه بعضا ژنوتیپ‌های ممتازی مشاهده می‌گردد که دارای خصوصیات مطلوب بسیاری می‌باشند. بدین ترتیب نگهداری وتکثیر این ژنوتیپ‌های مطلوب دشوار بوده و تولید بذر مرغوب و یکدست در این گیاه با مشکلات زیادی مواجه است. یکی از تکنیک‌هایی که در این مورد کاربرد فراوانی دارد، بذر مصنوعی (Artificial seed) می‌باشد. بذر مصنوعی در واقع مشابه بذر بتانیکی بوده و شامل یک جنین سوماتیکی احاطه شده با یک پوشش حفاظتی می‌باشد. این پروژه به منظور بررسی قابلیت تولید بذر مصنوعی در ایران وبهینه‌سازی تولید بذر مصنوعی در مراحل القاء کالوس‌زایی، کشت سوسپانسیون، مقاوم سازی جنین‌های رویشی به خشک و کپسوله کردن جنین‌های رویشی ارقام جنین‌زا، بر روی ۱۳ رقم یونجه، به اجرا در آمد. در بین ۷ محیط کشت القایی (محیط SHK و ۴ محیط SHK تغییریافته و محیط B5h و B5h تغییریافته)، بهترین محیط کالوس‌زایی، محیط SHK تغییر یافته با ۴۳۵۰ میلی گرم سولفات پتاسیم (با نام محیط SHK4) و در بین ۱۳ رقم یونجه، تنها رقم جنین‌زا، رقم رنجلندر گزارش گردید. در بین ۹ محیط کشت سوسپانسیون B5 تغییریافته بهترین محیط، محیط پایه B5 حاوی ۱۰ درصد مالتوز و ۱۰درصد ساکاروز و ۰/۵mg/l 2,4-D دیده شد. به منظور بررسی بهترین تیمار هورمونی برای مقاوم سازی جنین‌های رویشی به خشکی از ۴ سطح اسید آبسزیک (ABA) (۰، ۰/۵، ۱، ۳ و ۵ میلی‌گرم در لیتر) در محیط Boi2Y II با مدت زمان نگهداری متفاوت (۳، ۷، ۱۴ و ۲۱ روز) به همراه طول زمانهای خشک کردن (۰، ۱، ۳ و ۵ روز) استفاده شد. در پایان این مرحله ABA با غلظت ۳mg/l با مدت زمان نگهداری ۵ روز در محیط بلوغ ۲ (Boi2Y II) و زمان خشک کردن ۳ روز، بهترین جنین‌های رویشی مقاوم به خشکی و خشک شده را ایجاد نمود. در مرحله کپسوله کردن از ۲ نوع آلژینات سدیم LF و LB (۰/۵، ۱/۵، ۲، ۳ و ۴ درصد) استفاده شد. بیشترین جوانه‌زنی جنینهای کپسوله در هر دو محیط این‌ویترو و پیت‌ماس مربوط به آلژینات سدیم نوع LF با غلظت ۲ درصد بود.

فهرست مطالب

عنوان — صفحه

چکیده ..... پنج

فهرست مطالب ..... شش

فصل اول: مقدمه

۱- مقدمه ۱

۱-۱ مراحل تولید بذر مصنوعی ۱

۱-۲ اهمیت بذر مصنوعی ۲

۱-۳ ارزش اقتصادی بذر مصنوعی ۳

۱-۴ اهداف تحقیق ۳

فصل دوم: کلیات

۲-۱ تاریخچه ۵

۲-۲ گیاهشناسی یونجه ۶

۲-۳ اهمیت اقتصادی یونجه ۹

۲-۴ ارزش غذایی یونجه ۹

۲-۵ ژنتیک وروش‌های به‌نژادی در یونجه ۱۰

۲-۶ ژنتیک یونجه ۱۰

۲-۶-۱ تفکیک صفات ۱۱

۲-۷ انواع روش‌های اصلاحی به کار گرفته شده در یونجه ۱۳

۲-۷-۱ انتخاب توده‌ای ۱۳

۲-۷-۲ روش‌های اصلاحی یونجه برای چند صفت توام ۱۴

۲-۷-۲-۱ انتخاب تک بوته ۱۵

۲-۷-۲-۲ ارقام ساختگی ۱۵

۲-۷-۲-۳ ارقام مرکب ۱۶

۲-۷-۲-۴ هیبریداسیون ۱۶

۲-۸ بذر مصنوعی ۱۷

۲-۹ کاربرد بذور مصنوعی ۱۸

فصل سوم: بررسی منابع

۳-۱ تاریخچه بذر مصنوعی ۲۲

۳-۲ کشت بافت در یونجه ۲۶

۳-۲-۱ جنین‌زایی سوماتیکی ۲۶
۳-۲-۱-۱ قابلیت ایجاد جنین ۲۷
۳-۲-۱-۲ القاء جنین‌زایی ۲۹
۳-۲-۱-۳ تمایز و بلوغ ۳۵
۳-۲-۲ القاء جنین‌زایی سوماتیکی از دیدگاه ژنتیکی ۳۸
۳-۳ پتانسیل تولید انبوه ۴۱
۳-۳-۱ کشت سوسپانسیون ۴۳
۳-۴ مقاومت به خشکی ۴۵
۳-۵ کپسوله کردن بذر مصنوعی با هیدروژل ۴۸
۳-۵-۱ فرایند اتوماتیک کپسوله کردن ۴۸
۳-۶ تحقیقات انجام شده در ایران ۴۹

فصل چهارم: مواد و روش‌ها

۴-۱ ارقام یونجه ۵۲
۴-۲ نمونه‌برداری ۵۲
۴-۳ کشت بافت ۵۴
۴-۳-۱ القاء کالوس‌زایی ۵۴
۴-۳-۲ کشت سوسپانسیون ۵۶
۴-۳-۳ بلوغ ۵۷
۴-۳-۳-۱ مرحله نمو (Development) ۵۷
۴-۳-۳-۲ بلوغ ۱ (Maturation I) ۵۷
۴-۳-۳-۳ بلوغ ۲ (Maturation II) ۵۷
۴-۴ مرحله خشک کردن (Desiccation) ۶۰
۴-۵ کپسوله کردن ۶۰
۴-۶ آزمایشات تکمیلی ۶۳
۴-۶-۱ بهینه‌سازی جنین‌زایی سوماتیکی در کشت سوسپانسیون ۶۳
۴-۶-۲ بهینه‌سازی درصد تبدیل و جوانه‌زنی جنین ۶۴
۴-۶-۳ بهینه‌سازی کپسوله کردن جنین‌های سوماتیکی بالغ ۶۴

فصل پنجم:نتایج و بحث

۵-۱ بررسی کالوس‌زایی و باززایی در ارقام مختلف یونجه ۶۶
۵-۱-۱ تاثیر تیمارهای مختلف بر کالوس‌زایی و باززایی یونجه ۶۷
۵-۱-۱-۱ محیط کشت ۶۷

۵-۱-۱-۲ رقم ۷۰
۵-۱-۱-۳ ریزنمونه ۷۲
۵-۲ تاثیر انواع محیطهای کشت سوسپانسیون بر روی مراحل مختلف جنین‌زایی ۷۴
۵-۲-۱ تاثیر تیمار محیط کشت سوسپانسیون و ریزنمونه بر روی تعداد جنین کروی شکل در محیط Boi2Y I ۷۵
۵-۲-۲ تاثیر تیمار محیط کشت سوسپانسیون و ریزنمونه بر روی تعداد جنین قلبی شکل در محیط Boi2Y I ۷۸
۵-۲-۳ تاثیر تیمار محیط کشت سوسپانسیون و ریزنمونه بر روی تعداد جنین خنجری شکل در محیط Boi2Y I ... ۸۱
۵-۲-۴ تاثیر تیمار محیط کشت سوسپانسیون و ریزنمونه بر روی تعداد جنین لپه‌ای شکل در محیط Boi2Y I ۸۴
۵-۲-۵ تاثیر متقابل انواع محیط کشت سوسپانسیون با ریزنمونه بر تعداد جنین‌های کروی، قلبی، خنجری و لپه‌ای شکل در محیط بلوغ ۱ ..... ۸۶
۵-۳ بهینه سازی فاز بلوغ بر افزایش درصد تبدیل وجوانه‌زنی جنین های رویشی رقم رنج لندر ۹۱
۵-۳-۱ بررسی تیمار اسید آبسزیک بر روی افزایش تبدیل و جوانه زنی جنینهای رویشی رقم رنج لندر ۹۳
۵-۳-۲ بررسی میانگین تیمار ریزنمونه بر روی افزایش تبدیل و جوانه زنی جنینهای رویشی رقم رنج لندر ۱۰۰
۵-۳-۳ بررسی میانگین تیمار مدت ماندگاری جنین در فاز بلوغ ۲، بر روی افزایش تبدیل و جوانه زنی جنینهای رویشی رقم رنج لندر ۱۰۳
۵-۳-۴ بررسی میانگین اثر متقابل ۴ تیمار غلظت اسید آبسزیک، طول زمان ماندگاری، مدت زمان خشک کردن و ریزنمونه با یکدیگر بر روی جنین‌زایی رویشی رقم رنج لندر ۱۰۵
۵-۴ کپسوله کردن ۱۰۸
۵-۴-۱ بررسی تیمار آلژینات بر ریشه‌زایی و جوانه‌زنی بذر مصنوعی ۱۱۰
۵-۴-۲ بررسی تیمار غلظت آلژینات بر ریشه‌زایی و جوانه‌زنی بذر مصنوعی ۱۱۱
منابع ۱۱۷

مقدمه

۱- مقدمه:

تکنولوژی بذر مصنوعی (یا بذر سوماتیک یا ساختگی) یکی از شاخه های بسیار فعال و در حال توسعهٔ علوم گیاهی در دههٔ گذشته است. بذور ساختگی یا مصنوعی ساختار هایی شبیه بذر زنده هستند که از جنین های رویشی حاصل از کشت درون شیشه ای پس از کپسوله کردن با یک هیدروژل به دست می آیند. این جنین های رویشی محافظت شده به نام بذور مصنوعی[1] نامیده می شوند جنین های درون شیشه ای از بافت کالوس به وجود می آیند و القاء آنها با ساخت محیط کشت جنین زایی رویشی حاوی نسبت مناسبی از اکسین ها و سیتوکینین ها، آغاز می شود. تفاوت بذر مصنوعی با بذر طبیعی در عدم وجود آندوسپرم و پوسته بذر، می باشد. چنین بذوری (جنینهای رویشی لخت) وقتی در شرایط مزرعه قرار می گیرند با میکروب ها آلوده شده و به سرعت خشک می شوند. از این رو برای جلوگیری از این مشکلات، این بذور به وسیلهٔ یک ژل محافظت کننده مثل آلژینات کلسیم[2] به همراه یک محیط غذایی مناسب (به عنوان آندوسپرم) کپسوله می شوند. این شبه جنین های کپسوله شده می توانند در برابر شرایط نامطلوب مزرعه ای بدون خشک شدن مقاومت کنند. این بذور شبیه بذر واقعی نمو می کنند و به عنوان جانشین بذور طبیعی استفاده می شوند. همچنین این بذور می توانند مستقیماً در مزارع یا در گلخانه کشت شوند.

۱-۱- مراحل تولید بذر مصنوعی:

مراحل ذیل برای تولید تجاری بذر مصنوعی ضروری هستند:

۱- تولید بافت جنین زا.

۲- تولید انبوه جنین های رویشی متقارن.

---

1 . synthetic seeds
2 . Calcium Alginate

۳- بلوغ جنین های رویشی.

۴- فرآیند کپسوله کردن/ پوشش دادن (با پوشش) غیر سمی.

۵- اندوسپرم/ مگاگامتوفیت مصنوعی بر اساس گونه ها.

۶- قابلیت ذخیره سازی بذور مصنوعی.

۷- فراوانی بالا، تبدیل مستقیم گلخانه/ خزانه مزرعه، بر اساس نیاز های تولید.

۸- تنوع کم ژنتیکی و اپی ژنتیکی.

۱-۲- اهمیت بذر مصنوعی:

بذور مصنوعی می‌توان به عنوان سیستم ریز ازدیادی کم هزینه، و در حجم زیاد در نظر گرفته شود. که با بذور واقعی و نشاکاری قابل رقابت خواهد بود. از جمله موارد اهمیت و کاربرد بذور مصنوعی می توان به موارد زیر اشاره کرد:

۱- امکان تولید تعداد زیادی جنین مشابه وجود دارد.

۲- تکثیر با خصوصیاتی همچون هزینهٔ کم و حجم زیاد تکثیر بذر.

۳- این بذور می توانند در زمان کوتاه (یک ماه) تولید شوند در حالیکه بذور طبیعی فرآوردهٔ نهایی مراحل زادآوری پیچیده ای هستند و اصلاح گران برای اصلاح واریته ای جدید باید مدت زمان طولانی انتظار بکشند.

۴- بذور مصنوعی می تواند در هر زمان و در هر فصلی از سال تولید شوند.

۵- خواب، قابلیت معمول بذر طبیعی است. اما در مورد بذور مصنوعی دورهٔ خواب می تواند به مقدار زیادی کاهش یافته که در این صورت چرخهٔ زندگی یک گیاه کوتاه می گردد.

۶- این بذور در حفاظت از ژرم پلاسم مفید هستند.

۷- امکان تولید تعداد زیادی گیاه از بافتهای ترانسفورم شده به ویژه در درختان باغی و جنگلی وجود دارد.

برای تولید و محافظت بذور مصنوعی کپسوله کردن ضروری است. کپسوله کردن با انواع مختلفی از هیدروژل هایی که در آب حل می شوند انجام می گردد. ژل یک مادهٔ ترکیبی است که در غلظت های مختلف استفاده می شود.

۱-۳- ارزش اقتصادی بذر مصنوعی:

ارزش بذور مصنوعی (بر پایهٔ سیستم یونجه) ۲۶۱/۳۶ دلار به ازای هر میلیون واحد بذر یا ۰/۲۶ محاسبه شده بود که قابل مقایسه با محصولات زراعی همچون سبزیجات هیبرید و گل ها می باشد. اگرچه قیمت بذر یونجه به طور قابل توجهی کمتر از بذور مصنوعی است، اما برای استفاده از بذر مصنوعی در برنامه های اصلاحی کوچک گلخانه ای ممکن است دارای مزایایی می‌باشد.

۱-۴- اهداف تحقیق:

مهمترین هدف اجرای این پروژه، بررسی امکان دستیابی ایران به تکنولوژی تولید بذر مصنوعی و شناخت موانع موجود می‌باشد و گیاه یونجه برای شروع این پروژه انتخاب گردید. یونجه یکی از مهمترین گیاهان علوفه‌ای جهان است که نقش بسیار مهمی در تامین علوفه دارد. این گیاه خودناسازگار و دگرگشن می‌باشد. از این رو روشهای مرسوم اصلاحی برای تولید ارقام پرمحصول، در یونجه کارایی چندانی ندارد. در بین گونه‌های وحشی و در مزارع یونجه نیز بعضاً ژنوتیپهای ممتازی مشاهده می‌گردد که دارای خصوصیات مطلوب بسیاری می‌باشند. بدین ترتیب نگهداری و تکثیر این ژنوتیپ‌های مطلوب دشوار بوده و تولید بذر مرغوب ویکدست در این گیاه با مشکلات زیادی مواجه است. یکی از تکنیکهایی که در این مورد کاربرد فراوانی دارد، تولید بذر مصنوعی است. علاوه بر این، یونجه یکی از معدود گیاهانی است که روند جنین زایی در آن به مقدار زیادی بررسی گردیده است. از جمله اهداف فرعی این پروژه نیز می توان به موارد زیر اشاره کرد:

۱- بررسی وضعیت جنین زایی رویشی یونجه.

۲- رسیدن به بهترین پروتکولهای اجرایی در زمینه تولید جنین رویشی در یونجه.

۳- بهینه سازی روند تولید انبوه جنین رویشی در یونجه.

۴- بهینه سازی کپسوله کردن جنینهای رویشی در یونجه.

کلیات

۲-۱- تاریخچه:

طبق نظر واویلوف دانشمند روسی، مبدا یونجه مرکز خاور نزدیک، آسیای صغیر، قفقاز و ایران است. مرکز جغرافیائی یونجه را غالبا کشور ایران می دانند. بطوریکه ۲۴ گونه از ۸۶ گونه شنا سایی شده در دنیا متعلق به ایران است. باید گفت که یونجه مدتها پیش از زمانی که از آن ذکری به میان آمده باشد کشت می شد و هم اکنون نیز بطور وحشی در اکثر نقاط دنیا رشد می کند. یونجه از لحاظ مبدا دارای دو مرکز است. نخستین مرکز آن ناحیه کوهستانی قفقاز است که ارقام جدید یونجه های اروپائی از آن بدست آمده است و دومین مرکز مستقل پیدایش را آسیای مراکزی می دانند (۶).

تاریخچه یونجه، سرگذشت مهمترین گیاه علوفه ای دنیا و اولین گیاه علوفه ای اهلی شده است که بشر اولیه اهمیت و ارزش آن را بعنوان غذای دام تشخیص داده است. از نظر تکاملی، توجه به کشت یونجه بطور چشمگیری موفقیت آمیز بوده است که علت این امر شاید وجود سیستم ریشه ای مناسب آن است که قرون متمادی با تکامل همزیست باکتری ریزوبیوم و ریشه یونجه، گیاه یونجه به یک منبع ازت سرشاری دست یافته است که نیاز این گیاه به این عنصر غذایی را مرتفع می نماید. از طرفی ریشه یونجه بعلت عمیق و راست بودن، توانایی کافی در جذب رطوبت از اعماق خاک را داراست که گیاه را در شرایط خشکی از خطر بی‌آبی نجات می دهد. همچنین گیاه یونجه در اثر خشکی و سرما به حالت رکود و خواب رفته و بعد از مهیا شدن شرایط مناسب به رشد خود ادامه می دهد. ساقه های خزنده یونجه و ریشه های خزنده زیر زمینی و طوقه به خاک نشسته یونجه، مقاومت گیاه را در مقابل سرما و یخبندان افزایش می دهد(۶ و ۹).

ظاهرا ارزش یافتن گیاهان علوفه ای، همزمان با اهلی کردن حیوانات وحشی بوده است. کشت آن از قدیم الایام در ایران معمول بوده است و بصورت علوفه سبز یا خشک، مخلوط با کاه به مصرف تغذیه دام، به ویژه اسب می‌رسیده است. تاریخ کشت یونجه به دوره مادها و هخامنشی‌ها می‌رسد. در مورد چگونگی وارد شدن یونجه به یونان چنین گزارش کرده‌اند که در نتیجه شکست خشایار شاه در سال ۴۷۹ پیش از میلاد و عقب‌نشینی ارتش ماد از خاک یونان، یونانیان اولین بقایای یونجه زارهایی را که مهاجمان در پشت سنگر هایشان جهت تغذیه اسبهای بارکش، شترها و حیوانات اهلی و خانگی کاشته بودند، مشاهده کردند و این گیاه را به مناسبت اینکه به مادها تعلق داشت، مدیک نامیدند. بعد این واژه در ادبیات به مدیکا و در مجموعه لغات و اصطلاحات علمی گیاه شناسی به مدیکاگو تبدیل و بکار

برده شده است. یونجه در دوره سلسله مادها، جزو علوفه اسب محسوب مـی شـد و بـه همـین جهـت ریشه گیاه شناسی آن، Herba Media که به معنی علف مادها آمده است (۷).

همچنین قدیمی‌ترین سوابق نشان می دهد که یونجه های یکساله، برای اولین بار در ایران کشت شده اند و حدود ۴۰۰ سال قبل از میلاد، بذر آن به وسیله کاروانهای تجارتی به اروپا برده شـده و تـا قـرن شانزدهم میلادی، درباره این نبات، اطلاعات بسیار کمی وجود داشته است. این گیاهـان، اغلـب بـومی مناطق ساحلی اطراف مدیترانه با خاکهای سبک وآب و هوای معتدل، بارانهای زمسـتانه و تابسـتانهای طولانی و گرم و خشک می باشند (۷) .

۲-۲- گیاهشناسی یونجه:

یونجه بر اساس رده بندی عالم گیاهان ،به شرح زیر طبقه بندی می شود .

شاخه	پیدازادان	Phanerogame
زیر شاخه	نهاندانگان	Angiospermes
رده	دو لپه ها	Dicotyledones
زیر رده	جدا گلبرگها	Doaly petals
راسته	گل سرخ	Rosaes
تیره	بقولات	Fabacea
زیر تیره	پروانه آسا	Papilionaceae
طایفه	برگچه ایها	Trifolium
جنس	یونجه	Medicago

خانواده بقولات از جمله بزرگترین خانواده گیاهان گلدار می باشند. این خانواده مشتمل بر ۶۰۰ جنس و ۱۸۰۰۰ گونه است. جنس یونجه از گیاهان علفی بوده و بیش از ۶۰ گونه دارد که تعداد یـک سـوم آنها چند ساله و دو سوم آنها یکساله می‌باشند. تعدادکروموزوم پایه جـنس یونجـه **X=7** و **X=8** مـی باشد.

سطح پلوئیدی متفاوتی که در این جنس شناخته شده‌اند عبارتند از :

دیپلوئیدی **2n=2x=14** و **2n=2x=16**

تتراپلوئیدی **2n=4x=32**

هگزا پلوئیدی **2n=6x=48**

فرمهای دیپلوئید آن معمولا یکساله و دوام کمتری دارند، در صورتی که فرمهای تتراپلوئید آنها چند ساله و سطح زیادی را در زراعت این گیاه اشغال می‌کنند (۶).

خانواده پروانه آساها گیاهانی هستند درختی، درختچه‌ای، بوته‌ای، علفی یکساله یا چند ساله، بالارونـد و پیچان، برگها متفاوت، عموما مرکب شانه‌ای که گاهی بر اثر کـاهش تعـداد برگچـه هـا بـه برگهـای مرکب سه برگچه‌ای تبدیل شده‌اند یـا پنجـه‌ای هسـتند و بنـدرت سـاده و یـک برگچـه‌ای‌انـد، غالبـا گوشوارک‌دار بوده و گوشوارکها آزاد یا کاملا به دمبرگ پیوسته‌اند یا بصورت خارهای محکـم و سـخت تبدیل شده‌اند. گلها ساختاری ویژه دارند و بصورت نامنظم و نرمـاده هسـتند. کاسـه گـل دارای پـنج کاسبرگ به هم پیوسته، جام گلها قسمتی به شکل پروانه، گلبرگها در داخل غنچه همپـوش، گلبـرک فوقانی بزرگتر در برگیرنده گلبرگهای جانبی، گلبرگهای پائینی غالب بهم پیوسته و تشکیل دهنده ناو، غالبا میله ۹ پرچم قدامی به هم پیوسته و پرچم پشتی آزاد،گاهی میله تمام پرچم ها به هم پیوسته و ندرتا میله همه پرچم ها آزاد، کیسه بساک یک یا دو شکلی، تخمدان یک برچه ای غالبا یک خانـه‌ای، تخمک واژگون، چند تایی یا بندرت منفرد، میوه از نوع نیام، دانه هـا غالبـا دارای آندوسـپرم یـا فاقـد آندوسپرم هستند (۹).

یونجه دارای ریشه‌ای راست و مستقیم که به نام ریشه اولیه یونجه معروف است، می‌باشد. ایـن ریشـه بعد از قرار گرفتن بذر در خاک و جذب رطوبت ظاهر شده و بدون انشعاب است. به موازات تشکیل این ریشه قسمت زیر لپه یا هیپوکوتیل در زیر سطح خاک نمودار می شود و طویل شدن آن باعث جوانـه زدن می‌شود که در این مرحله گیاهی حساس نسبت به کمبود آب، افزایش بیش از حـد آب، شـوری خاک و سله بستن است. وقتی زیر لپه یونجه از سطح خاک نمودار گردد، در این موقع یونجـه جوانـه زده فقط دارای دو لپه یا کوتیلیدون است که بصورت برگهای متورم به نظر می آیند و بعد از مدتی از بین رفته و برگهای اصلی از مرکز آن بوجود می آیند که دارای دمبرگی طویل می باشند کـه معمـولا قلبی شکل بوده که بعد از طی زمان، نخستین برگ مرکب سه برگچه ای نمایان می‌شود (۹).

علاوه بر ریشه اصلی، ریشه های جانبی نیز از سلولهای حاشیه استوانه مرکزی ریشه اصلی نمودار می شود عامل موفقیت یونجه در مقابل عوامل نامساعد وجود سیستم مناسب ریشه می باشد. چند هفته بعد با رشد و نمو گیاه و ایجاد رابطه همزیستی ریشه گیاه با باکتریهای ریزوبیوم یونجه دیگر نیازی به ازت خاک ندارد. علاوه بر آن ریشه عمیق و راست یونجه موجب جذب رطوبت از اعماق تا ۵ متر نیز می شود که امتیاز با ارزشی در مقاومت به خشکی است. ساقه های خزنده روی زمین (استولون)، ریشه های خزنده زیر زمینی (ریزوم) از قسمتهایی هستند که در طول مدت رشد و نمو این گیاه به وجود می آیند. ساقه اصلی یونجه چهار گوش به نظر می رسد و مغز آن از سلولهای پارانشیمی نسبتا بلند و فشرده پر شده است و دارای انشعابات بسیار زیاد و ظریفی است که هر کدام برگهای مرکب زیاد دارد. ساقه یونجه در نزدیک سطح خاک، انشعابات زیادی تولید کرده که به مرور زمان چوبی و ضخیم می شود و به طوقه تبدیل می‌گردد. از این محل ساقه های کوتاه منشعب و ضخیم بوجود می آید که تبدیل به ساقه های بلند و اصلی یونجه می شود. تعداد ساقه ها بین ۵ تا ۴۰ عدد است که از ناحیه طوقه خارج می شود و از هر ساقه بعد از چیدن یا رسیدن، ساقه دیگری تولید می شود. بعد از گذشت چند سال طوقه بصورت توده انبوهی در می آید که در داخل خاک و یا خارج از آن قرار می گیرد. ساقه های هوایی راست، سبز رنگ و پوشیده از کر ک های نرم است. ارتفاع این ساقه ها در ارقام مختلف، در برداشت های مختلف، در مناطق گوناگون و در خاکها، با یکدیگر متفاوت است (۳۰).

برگهای یونجه مرکب، رنگ برگچه های یونجه سبز تیره، تخم مرغی، سطح زیرینشان پوشیده از کرک است. برگچه و سطح برگ یک دمبرگچه کوتاه دارد ولی برگچه های جانبی فاقد دمبرگچه می‌باشند. در قاعده دمبرگ دو گوشوارک یا اسیپول وجود دارد که به دمبرگ متصل هستند، هر کدام زائده ای باریک و باند در انتها و نیز دندانه‌هائی ظریف و کوچک در قاعده دارد. برگچه های یونجه کشیده، طویل و تقریبا در انتها آن مضرس است. برگچه ها دارای یک رگبرگ اصلی یا رگبرگچه هستند که تا راس برگچه امتداد می یابد و از این رگبرگچه اصلی، رگبرگچه های فرعی منشعب می شود(۹).

گل یونجه دارای خصوصیات ویژه‌ای است. رشد و نمو گل یونجه، از انتهای شاخه ها با تغییر حالت از رشد و نمو رویشی به زایشی آغاز می‌شود. این تغییر حالت در فصل از دهمین تا چهاردهمین گره از طوقه یونجه و در فصل تابستان از ششمین تا دهمین گره صورت می گیرد. بنابراین مفهوم آن این است که یونجه هایی که در بهار به گل می نشینند دارای رشد و نمو زیادتری هستند و ارتفاع کمتری

دارند. هر گل دارای یک کاسه، یک جام، ده پرچم و یک مادگی است . کاسه گل شامل پنج کاسبرگ متصل است که به پنج قسمت یا دندانه تقسیم می شود و طول هر قسمت تقریبا برابر طول کاسه است. جام گل شامل ۵ گلبرگ به نامهای درفش، بال و ناو به هم پیوسته است. رنگ گل یونجه معمولا شبهی از رنگ ارغوانی یا بنفش است . رنگ گل یونجه داسی مدیکاگو فالکتا، زرد تیره و رنگ یونجه مدیکاگو لوپولینا، زرد رنگ است. رنگ گل ارقام مختلف گونه های جنس مدیکاگو ممکن است سفید، زرد و یا بنفش، زرد و یا رنگارنگ باشد. مادگی یونجه شامل یک برچه یا تخمدان فوقانی، خامه صاف و میان تهی و کلاله مشخص است. تخمک ها بطور متناوب در طول شکاف شکمی تخمدان تشکیل می شوند. معمولا ده تا دوازده تخمک در تخمدان یونجه رشد می کند، ولی تعدادشان ممکن است بین شش تا هیجده عدد تغییر کند. درون گل یونجه، ده پرچم قرار دارد که نه عدد آنها به هم متصل و دهمین پرچم، نزدیک به درفش آزاد است .میله های پرچم مادگی را احاطه می کند (۹).

۲-۳- اهمیت اقتصادی یونجه:

یونجه گیاهی است که بیشترین تولید را در میان علوفه ها را در دنیا به خود اختصاص داده است. در دنیا یونجه بعنوان غذای دام بطور مستقیم بصورت چراگاه و یا در دامداریها ی صنعتی مورد استفاده قرار می گیرد و بعنوان منبع هیدرات کربن و پروتئین دام مورد استفاده قرار می گیرد (۱۱).

۲-۴- ارزش غذایی یونجه:

یونجه یکساله از نظر مواد متشکله، همانند یونجه چند ساله است و تغییرات چندانی با یونجه‌های چند ساله ندارد. میزان مواد موجود در یونجه بستگی به نوع خاک، آب و هوا، رقم، تاریخ کشت و سرعت رشد دارد. در ضمن ترکیب شیمیایی این گیاه بر حسب آنکه عمل تجزیه بر روی گیاه جوان (قبل از گل دادن) یا در آغاز گل دادن و یا پس از پیدایش گل انجام گیرد، متفاوت بوده، به طوری که در گیاه جوان، مقدار پروتئین ها، زیادتر از آغاز گل دادن و بر عکس، مواد سلولزی و هیدراتهای کربن آن کمتر است (۷).

۲-۵- ژنتیک و روشهای به نژادی در یونجه:

روشهای اصلاحی برای افزایش عملکرد و ارزش تغذیه‌ای یونجه (*Medicago sativa* L.) بر پایه آگاهی از سیستم تولید مثل و ساختارژنتیکی گیاه استوار است. طبیعتا یونجه گیاه دایمی و دگرگشن است که گرده‌افشانی آن توسط زنبور صورت می‌گیرد. علاوه بر این خاصیت خود ناسازگاری یونجه که در نتیجه عدم موفقیت لوله‌های گرده خودی در نفوذ به خامه و یا عدم موفقیت لوله‌های گرده خودی در وارد شدن به داخل تخمک و شکست در کامل شدن باروری در پی رشد لوله گرده به طور طبیعی در خامه یا سقط و عدم موفقیت جنین در نمو و تبدیل به بذر پس از باروری می‌باشد، باعث کاهش خودگشنی می‌گردد. ولی با این حال یونجه دارای گل کامل می‌باشد و می‌توان آن را به صورت دستی خودگشن کرد. یونجه یک گونه چند شکلی است که با بسیاری از خاکها و اقلیمها سازگاری دارد؛ و در سطح وسیعی از اقلیمها کشت می‌گردد. میزان تنوع در صفات وراثتی آن بسیار زیاد است. اینتروگرسیون گونه *M. falcate* به *M.sativa* باعث افزایش تنوع ژنتیکی و دامنه سازگاری آن شده است. توارث صفات در یونجه تا حدودی به خاطر ماهیت اتوتتراپلوئیدی تقسیم میوز پیچیده است و تشکیل گامتهای دیپلوئید، رفتار تولید مثلی یونجه را شدیدا تحت الشعاع قرار می‌دهد (۶).

۲-۶- ژنتیک یونجه (*M.sativa*):

فرایر و گریشیلدز[1] اولین کسانی بودند که ماهیت تتراپلوئیدی یونجه با ۳۲ کروموزم را گزارش کردند(۶۳).

استانفورد[2] دلایل قاطعی را در مورد تفکیک اتوتتراپلوئیدی گزارش کرد. استانفورد اظهار می‌دارد که مطالعات اولیه ژنتیکی در مورد یونجه برای تمایز بین تقسیم آلو تتراپلوئیدی یا اتوتتراپلوئیدی میوز کامل نبوده است ودر این زمینه مطالعه نسل F3 از اهمیت خاصی برخوردار است (۱۰۶).

تا قبل از سال ۱۹۴۲، تنها تیسدال و همکاران[3] اتوتتراپلوئیدی یونجه را گزارش کرده بودند. آنها بیان داشتند که نسبتهای ژنتیکی برای بسیاری از صفات در قالب نسبتهای تفکیک ژنتیکی اتوتتراپلوئیدی به خوبی وحتی بهتر از نسبتهای گزارش شده و پیچیده دیپلوئیدی می‌گنجند (۱۱۲).

و بالاخره لدینگهام و ژولن[4] دلایل سیتوژنتیکی دال بر اتوتتراپلوئید بودن *M.sativa* ارائه دادند (۶۵).

---

1. Fryer and Greenshields.
2. Stanford
3. Tysdal, 1942.

در یک آلوتتراپلوئید واقعی فقط بی‌والانت دیده می‌شود. اگرچه احتمال دارد که به علت جابجایی متقابل قطعات کروموزمی، گاهی مولتی والانت نیز مشاهده می‌شود. جفت شدن کروموزمها به صورت بی‌والانت بدون وجود ارتباطات کوادری‌والانتی در اتوتتراپلوئیدی حقیقی نادرست و وجود کوادری والانت صفت مشخصه اتوتتراپلوئیدها می‌باشد. بنابراین در یک اتوپلوئید واقعی انتظار می‌رود که تشکلهای کوادری بی‌والانتی مقادیری بین صفر تا حداکثر ممکنه (بسته به تعداد کروموزمها) را به خود بگیرد (۲۳).

۲-۶-۱- تفکیک صفات:

تفکیک کاملا تصادفی صفات که از خصوصیات تتراپلوئیدهای ایده‌آل است ، در تمامی مطالعات ژنتیکی یونجه مشاهده نشده است . از جمله علل آن می‌توان به جفت شدن ترجیحی کروموزمها اشاره کرد؛ جفت شدن ترجیحی در ارتباط با یک لوکوس می‌تواند هموژنیک (همگن، جفت شدن انتخابی آللهای مشابه) یا هتروژنیک (ناهمگن، جفت شدن انتخابی آللهای غیر مشابه) باشد. بازل[5] (۱۹۹۵) نشان داد که چگونه تفاوت در جفت شدن ترجیحی کروموزمها باعث انحراف از نسبتهای ژنتیکی مورد انتظار می‌شود (۲۷).

عامل دیگر انحراف از تفکیک مستقل صفات ، کاهش مضاعف است که نسبتهای تفکیکی تعدادی از لوکوسهای یونجه را تغییر می‌دهد؛ اما به علت فراوانی کم، جفت شدنهای ۴ تایی کروموزمها (یکی از پیش نیازهای کاهش مضاعف) ، می‌توان وقوع کاهش مضاعف برای اغلب لوکوس‌ها را، نزدیک به صفر فرض کرد (۶).

علاوه بر پدیده‌های جفت شدن ترجیحی و کاهش مضاعف، تعدد عدم انفصال کروموزمها نیز نسبتهای تفکیکی مورد انتظار از تفکیک تصادفی را تغییر می‌دهد. عدم انفصال کروموزمهای‌مشابه منجر به تولید آنیوپلوئیدها می‌شود. بنابر تخمین بینگهام[6] تقریبا ۵ درصد از گیاهچه‌های یونجه آنیوپلوئیدند. وی نتیجه‌گیری کرد که این فراوانی آنیوپلوئیدی، تاثیر ناچیزی را بر نسبتهای ژنتیکی اعمال خواهد کرد، ولی می‌تواند منجر به اشتباه در آزمایش گردد (۹).

---

4. Ledingham
5 . Buzzell, 1995.
6 . Bingham