

تولید مثل و تلاقیهای بین گونه‌ای در یونجه‌های یکساله

حسین میرزایی ندوشن^(۱)

خلاصه

زمان و وضعیت گل در یونجه یکساله که در آن گرده قابلیت رشد لوله گرده را داشته و قادر به تلقیح می‌باشد و نیز چگونگی اخته کردن گل‌های حساس و بسیار ریز یونجه یکساله در تلاقیهای بین و درون گونه‌ای اساس این تحقیق بوده‌اند. به منظور یافتن زمان رسیدگی کیسه گرده و قابلیت تلقیح دانه گرده، گل‌های دو گونه *Medicago polymorpha* و *M. rigidula* در اندازه‌های مختلف مورد بازبینی قرار گرفته و کیسه‌های گرده از گل استخراج شدند و دانه‌های گرده در محیط کشت مصنوعی کشت گردیدند. بر این اساس مناسبترین اندازه گل جهت برداشتن کیسه گرده قبل از خود تلقیحی در هر دو گونه، زمانی تشخیص داده شد که هنوز گلبرگها به ویژه گلبرگ استاندارد از دندانه‌های کاسبرگ گل خارج نشده و رنگ زرد معمول را به خود نگرفته‌اند.

به منظور اخته کردن گلها در زمانی که هنوز دانه‌های گرده رسیدگی لازم را ندارند، از غلظت‌های مختلف الکل اتیلیک و نیز از دستگاه مکش و سوزن و پنس ظریف استفاده شد که بهترین روش باز کردن گل به وسیله تیغه ظریف جراحی و برداشتن پرچمها به وسیله سوزن ظریف یا دستگاه مکش در زیر بینوکولار تشخیص داده شد.

بعد از انجام تلاقیهای بین و درون گونه‌ای، به منظور حفظ تازگی و رطوبت مادگی بسیار ظریف گل و نیز جلوگیری از ریزش گل‌های اخته شده، استفاده از لوله آزمایش

۱- بخش تحقیقات ژنتیک و فیزیولوژی، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، تهران صندوق پستی ۱۱۶-۱۳۱۸۵

شیشه‌ای به جای پوشش کاغذی به مدت ۱۵ روز در دمای حدود ۲۵ درجه سانتیگراد، روش مطلوب تشخیص داده شد.

واژه‌های کلیدی: کیسه‌گرده، یونجه یکساله، تلاقی بین گونه‌ای،

M. rigidula Medicago polymorpha

مقدمه و کلیات

جنس *Medicago* ۳۴ گونه یکساله و ۵۱ گونه چند ساله دارد که شامل مهمترین گیاه علوفه‌ای لگوم یا یونجه نیز می‌شود (Small و Jomphe, ۱۹۸۸). گونه‌های یکساله که به طور عام *Medic* نامیده می‌شوند از نواحی مدیترانه منشأ گرفته‌اند که بین ۲۵۰ تا ۵۰۰ میلیمتر بارندگی دارند (Crawford, ۱۹۸۳). تعداد زیادی از این گونه‌ها از طریق انتقال غلافهای خاردار به وسیله دام و نیز قبایل کوچنده به دورترین نقاط دنیا گسترش یافته‌اند. بیشتر یونجه‌های یکساله دوره زندگی مشابه دارند، ولی از نظر صفات ظاهری و زراعی نظیر اندازه بذر، بنیه گیاهچه، تولید علوفه، زمان گلدهی و به ویژه شکل ظاهری غلاف میوه با هم متفاوتند (Crawford و همکاران، ۱۹۸۹). در نواحی مدیترانه‌ای بیشتر یونجه‌های یکساله در طول زمستان رشد می‌کنند. بذر آنها پس از بارندگیهای بهاره جوانه زده و در طول بهار و اوایل تابستان تولید بذر می‌نمایند (Johnson و Rumbaugh, ۱۹۸۶). تولید بذر زیاد جهت دوام رویش یونجه‌های یکساله امری ضروری است. سختی بذر که موجب زنده ماندن طولانی مدت بذر در خاک می‌شود به این گونه‌ها این امکان را می‌دهد که در دوره‌های طولانی خشکی دوام بیاورند (Quinlivan, ۱۹۷۱). یونجه‌های یکساله در اصل در برابر خشکی مقاوم هستند و این مقاومت موجب می‌شود که این گونه‌ها در مناطقی که دارای بارندگی کم هستند نیز رویش مناسبی داشته باشند

(Moynihan و همکاران، ۱۹۹۶). یونجه‌های یکساله در برابر سرما نیز مقاومت مناسبی از خود نشان می‌دهند و از نظر مقاومت در برابر آفات، بنیه گیاهی، تولید علوفه با کیفیت بالا، تولید بذر زیاد و تنوع صفات مورفولوژیک نیز مناسب هستند (De Hann و Bernes، ۱۹۹۸). با این حال رشد و نمو یونجه‌های یکساله به میزان زیادی تحت تاثیر شرایط محیطی است. به طوری که گلدهی یک گونه در شرایط روز طولانی و گرم ممکن است پس از بیست روز بعد از کاشت نیز اتفاق بیفتد (Zhu و همکاران، ۱۹۹۶). میزان تولید ماده خشک در یونجه‌های یکساله متفاوت ذکر شده است. از جمله Mohammad و Qamar (۱۹۸۸)، از پاکستان تولید پنج گونه مختلف یونجه یکساله را ۱/۵ تا ۵/۷ تن برآورد نموده اند. بسیاری از گونه‌های یونجه یکساله رشد سریعی دارند که موجب تولید زیاد علوفه می‌گردند (Diwan و همکاران، ۱۹۹۴). تعدادی از لگوها از جمله یونجه‌های یکساله در سال اول رویش بیش از لگوهای چند ساله علوفه تولید می‌نمایند (Guldan و همکاران، ۱۹۹۷).

یونجه‌های یکساله نظیر *M. polymorpha* L. خودگشن بوده و بومی مناطق اطراف دریای مدیترانه به شمار می‌روند. یونجه‌های یکساله به طور معمول در مناطقی با آب و هوای مدیترانه‌ای به عنوان گیاهان یکساله زمستانه مورد کشت و کار قرار می‌گیرند ولی این گیاهان در اقلیم گرم به عنوان گیاهان یکساله تابستانه مورد استفاده قرار می‌گیرند (Johnson و Rumbaugh، ۱۹۸۶). گونه‌های مختلف یونجه یکساله از جمله *M. polymorpha* در زمره گیاهان مهم محسوب می‌شوند و در مراتع شرق استرالیا به طور مستقیم مورد چرا قرار می‌گیرند (Young و همکاران، ۱۹۹۶). تنوع ژنتیکی گسترده‌ای در توده‌های مختلف این گونه‌ها مشاهده می‌شود که می‌تواند به عنوان مواد ژنتیکی مورد نیاز به‌نژادگران مورد استفاده قرار گیرد.

اثر یونجه‌های یکساله بر برداشت آب از خاک نیز مورد بررسی قرار گرفته است (Badaruddin و Meyer، ۱۹۸۹؛ Biederbeck و Bouman، ۱۹۹۴). پوشش

کامل خاک با لگومها از جمله یونجه یکساله علاوه بر کاهش جوانه زنی بذر علفهای هرز به کاهش تغییرات دمای خاک نیز کمک می نماید (Midmore, ۱۹۹۳). در مقایسه با تعدادی از لگومها، یونجه یکساله کمتر خاک را اسیدی می نمایند (Tang و همکاران، ۱۹۹۸).

مزایای کشت یونجه‌های یکساله: در بعضی از کشورهای پیشرفته در اصل لگومهای مرتعی جزء لاینفک سیاستهای زراعی است تا از منابع آب و خاک حفاظت گردد (Frye و همکاران، ۱۹۸۸). به ویژه در کشت مخلوط با گیاهان دانه ریز به دلیل توانایی لگومها در تثبیت ازت هوا و حاصلخیز کردن آن با داشتن نسبت پایین کربن به ازت این گونه‌های گیاهی مورد توجه هستند (Biederbeck و Bouwman، ۱۹۹۴؛ Chatterton و Chatterton، ۱۹۹۶). یونجه‌های یکساله می‌توانند جایگزین آیش تابستانه گردند تا ضمن حاصلخیز کردن خاک از فرسایش آن در این مناطق نیز جلوگیری نمایند (Badaruddin و Meyer، ۱۹۹۰؛ Biederbeck و همکاران، ۱۹۹۳).

وارد کردن یونجه‌های یکساله به سیستم کشت گیاهان مرتعی در مناطق نیمه گرمسیری به طولانی شدن دوره رشد و افزایش عملکرد علوفه منجر شده است (Clarkson، ۱۹۸۹). بدیهی است این امر به دلیل تثبیت ازت هوا به وسیله یونجه و در اختیار گذاشتن آن برای مصرف سایر گونه‌های همراه خواهد بود. یونجه‌های یکساله گاهی سازگاری خصوصی زیادی از خود نشان می‌دهند به این صورت که ارقامی از یک گونه از یونجه یکساله به مناطقی که شرایط اقلیمی خاصی دارد سازگاری زیادی نشان داده و در رقابت با سایر گونه‌ها و ارقام وارداتی به این مناطق موفقتر خواهد بود.

در مقایسه با تعدادی از گونه‌های مختلف از لگومها و گراسها، در یونجه یکساله نسبت حجم ریشه به ساقه بسیار زیاد است (Crawford و همکاران، ۱۹۹۷). این ویژگی توان استفاده گیاه از آب موجود در خاک را به ویژه در شرایط خشک افزایش می‌دهد. از غلافهای یونجه یکساله می‌توان به عنوان مکمل غذایی در تعلیف دام با

علوفه‌های کم پروتئینی نظیر کاه گندم استفاده کرد (Chriyaa و همکاران، ۱۹۹۷ a و b).

یونجه‌های یکساله در تناوب با گیاهان زراعی کمتر از بسیاری از گیاهان دیگر آب مصرف کرده و از این نظر با گیاه اصلی کمتر رقابت می‌نمایند (Weston و همکاران، ۱۹۹۶). بر اساس مطالعات Smallwood (۱۹۹۶) بعضی از گونه‌های یونجه یکساله وقتی به عنوان گیاه پوششی در مزارع و باغها مورد استفاده قرار گیرند مانع خسارت زیاد مهره داران نیز می‌گردند.

بر اساس گزارش Ceciliani و همکاران، (۱۹۹۷) از بذر گونه *M. scutellata* و با استفاده از روشهای مختلف کروماتوگرافی، پروتئینی استخراج و خالص گردیده است که می‌تواند به عنوان حشره کش علیه تعدادی از آفات نباتی مورد استفاده قرار گیرد. علاوه بر افزایش ازت آلی خاک که به مرور در اختیار گیاهان همراه یونجه قرار داده می‌شوند، یونجه‌های یکساله موجب افزایش کربن آلی خاک نیز می‌گردند (Dalal و همکاران، ۱۹۹۵). غلافهای یونجه‌های یکساله جزء اصلی جیره غذایی دام در دوره‌های خشکی موجود در کشت مخلوط این گونه‌ها با سایر گونه‌ها در شرایط مدیریتانه‌ای است (Valizadeh، ۱۹۹۳).

گونه‌هایی از یونجه یکساله به عنوان گیاه پوششی^(۱) در کشت مخلوط با گیاهان زراعی مورد مطالعه و مقایسه قرار می‌گیرند. از جمله *M. minima* که در کشت مخلوط با ذرت اثر سویی بر تولید آن نداشته است (Abdin و همکاران ۱۹۹۸).

مطالعات ژنتیکی و اصلاحی یونجه‌های یکساله: بیشتر ارقام یونجه یکساله موجود در اثر ارزیابی توده‌های موجود و انتخاب در بین و درون توده‌ها حاصل گردیده است. کمتر رقمی از یونجه یکساله وجود دارد که با استفاده از دورگ گیری بین توده‌ای یا بین

گونه‌ای بدست آمده باشد. اصلاح و ایجاد یک رقم مطلوب زراعی یونجه یکساله جهت شرایط مختلف اقلیمی نیازمند ارزیابی توده‌های متعدد محلی و وارداتی از سایر نقاط جهان است تا توده‌ها و ارقامی که ویژگیهای مطلوب از جمله تولید علوفه مناسب دارند شناسایی شود. در این صورت یک بهنژاد گر می‌تواند چندین ویژگی را در یک توده یا رقم نیز جمع نماید. در برنامه‌های اصلاحی گیاهان زراعی و غیر زراعی از جمله یونجه یکساله دانستن نحوه وراثت صفات به ویژه صفات کیفی می‌تواند کمک مؤثری در اجرای برنامه باشد. این گونه صفات می‌توانند به عنوان صفات نشانگر^(۱) نقش مهمی را ایفا نمایند. در باره یونجه یکساله تاکنون کمتر در صفات کیفی و نحوه وراثت آنها تحقیق صورت گرفته است و اینگونه مطالعات انگشت شمار هستند. Simon، (۱۹۶۴) نحوه وراثت رنگیزه آنتوسیانین را در برگ، پیچش غلاف بذر در جهت عقربه‌های ساعت، و عدم وجود خار روی غلاف را در گونه *M. truncatula* Gaertn. مورد بررسی قرار داد. بر اساس مطالعات وی که در مورد نسلهای F2 و تلاقیهای برگشتی نسل یک با والدین مورد مطالعه صورت گرفته بود، رنگیزه آنتوسیانین و چرخش غلاف بذر در جهت عقربه‌های ساعت به وسیله یک آلل که غلبه کاملی بر همردیف خود دارد کنترل می‌شود. همین طور بر اساس این مطالعه بی خار بودن غلاف با یک آلل که نسبت به هم ردیف خود به طور کامل مغلوب است کنترل می‌شود. وراثت صفات نوع غلاف، رنگ ساقه و کوتولگی در رشد بوته^(۲) در یک توده دیپلوئید *M. polymorpha* توسط De Hann و Barnes، (۱۹۹۸)، مورد مطالعه قرار گرفت. بر اساس این مطالعات که در مورد نسلهای F1، F2 و F3 صورت گرفت صفت پیچندگی غلاف بذر با یک آلل با غالبیت کامل (*Spl*) بر همردیف خود کنترل می‌شود. رنگ قرمز ساقه نیز با یک آلل که به طور کامل بر همردیف خود غالب است (*RSl*) کنترل می‌شود. این دو ژن هیچ گونه

پیوستگی در کروموزوم نداشتند. گیاهان کوتوله ساقه‌ها، بندها، دمبرگهای کوتاه‌تر و برگهای کوچکتری نسبت به گیاهان معمولی دارند. بر اساس این مطالعات این صفت با دو ژن که به طور نسبی مغلوب و اثرات متقابل غیر آلی دارند ($Dw1$ و $Dw2$) کنترل می‌شوند.

Pathipanawat و همکاران (۱۹۹۷) جهت مطالعه توارث ویژگیهای غلاف بذر و مقاومت در برابر انتقال بیماری ویروسی توسط بذر در گونه *M. murex* نیز تلاقیهایی انجام داده و ثابت کردند که ویژگیهای غلاف بذر توسط یک تک ژن مغلوب کنترل می‌شود و هیچ تاثیری بر میزان انتقال ویروس از طریق بذر ندارد. در همین مطالعه ثابت شد که مقاومت در برابر انتقال ویروس از طریق بذر یک صفت پلی ژنیک و کمی است که بوسیله چندین ژن کنترل شود. در این مطالعه تنوع ژنتیکی وسیعی را از نظر میزان مقاومت در برابر انتقال ویروس از طریق بذر در میان توده‌های مختلف گونه *M. polymorpha* نیز مشاهده شد. در میان نمونه‌های مورد بررسی در بررسی مذکور درصد انتقال از ۳ تا ۵۲ درصد متغیر بود. همینطور آنها در میان توده‌های گیاهانی را پیدا کردند که هیچ گونه آلودگی ویروسی در نتاجشان مشاهده نشد. به عبارت دیگر در صد انتقال ویروس از طریق بذر این گیاهان صفر یا بسیار ناچیز بود. نتاج حاصل از این گیاهان نیز مورد آزمایشهای تکمیلی قرار گرفته و هیچ گونه ویروسی در آنها مشاهده نگردید. از نظر آلودگی به ویروس AMV^(۱)، Pathipanawat و همکاران (۱۹۹۵) گیاهان F_2 حاصل از ۶ تلاقی اصلی و تلاقیهای متقابل آنها را در توده‌ای از *M. murex* مورد بررسی قرار داده و مشاهده نمودند که میزان آلودگی در نتاج در طبقات مشخص و جدا از هم قرار نمی‌گیرند. بلکه تنوع پیوسته‌ای دارند که از پلی ژنیک بودن مقاومت در برابر این بیماری در گونه *M. murex* حکایت می‌کند. آنها در نتاج حاصل از ۱۴ تلاقی

برگشتی نیز همین نتیجه را گزارش نمودند. میزان انتقال آلودگی و ویروسی توسط بذر به نسل بعد در نتاج حاصل از F_2 بین صفر تا ۷۷ درصد و در نتاج حاصل از تلاقیهای برگشتی تا ۶۷ درصد متغیر بود. در همین مطالعه میزان انتقال و ویروس از طریق بذر در نتاج حاصل از تلاقیهای اصلی و تلاقیهای متقابل ۲۶ درصد گزارش شد. ولی این میزان در نتاج حاصل از تلاقیهای برگشتی ۱۷ درصد بود. در نتاج حاصل از F_2 میزان انتقال و ویروس در ۱۸ درصد از جامعه تولید شده بین صفر و ده درصد بود که به میزان قابل توجهی از میزان انتقال بیماری توسط بذر در والدین (۱۵ درصد) کمتر بود. این پدیده نشانگر تفرق برتر^(۱) است که در آن نتاج در باره یک صفت از مرزهای تعیین شده توسط والدین فراتر می‌روند. در نتاج حاصل از تلاقیهای برگشتی ۴۱ درصد از جامعه گیاهی تولید شده این وضعیت را از خود نشان دادند. از این رو این پدیده نیز از پلی ژنیک بودن صفت مقاومت در برابر انتقال و ویروس توسط بذر حکایت می‌کند. به عبارت دیگر این صفت کمی است و توسط چندین ژن کنترل می‌شود.

Pathipanawat و همکاران (۱۹۹۷) در نتاج F_2 حاصل از تلاقیهای انجام شده میان دو والد مختلف در *M. murex* که یکی دارای خار و دیگری بدون خار بودند سه دسته نتاج مشاهده نمودند.

- ۱ - نتاجی که غلاف بذر آنها خارهای زیاد و با بلندی ۱ تا ۱/۵ میلیمتر دارند.
 - ۲ - نتاجی که حد واسط بوده و غلاف بذر در آنها خارهایی به بلندی کمتر از یک میلیمتر تا برجستگیهای خار مانند داشتند.
 - ۳ - نتاجی که غلاف بذر در آنها فاقد خار بود.
- لازم به ذکر است که F_1 این تلاقیها فقط نوع دوم از غلافهای فوق الذکر را داشتند. ولی در F_2 تلاقیهای اصلی و برگشتی هر سه نوع غلاف مشاهده گردید و در نتاج حاصل

از تلاقیهای برگشتی تنها غلافهای نوع اول و دوم مشاهده شد، ولی غلاف نوع سوم مشاهده نشد. با تجزیه و تحلیل داده‌ها این نتیجه حاصل شد که یک ژن که نام sp به آن داده شد وقتی به صورت هموزیگوت در آید (spsp) حاصل آن غلافهای فاقد خار است و وقتی به صورت هتروزیگوت باشد (SpSp) نوع دوم از غلاف حاصل می‌شود و وقتی آلل Sp که غلبه نسبی دارد در گیاه به صورت هموزیگوت در آید (SpSp) نوع اول از غلاف که غلافهای بذر خارهای متعدد دارد حاصل می‌گردد. در این مطالعه همبستگی معنی داری بین میزان انتقال ویروس توسط بذر و میزان خاردار بودن غلاف مشاهده نگردید.

تلاقیهای بین و درون گونه‌ای در یونجه‌های یکساله: تلاقیهای بین گونه‌ای روشی متداول در انتقال صفات مفید از گونه‌ای به گونه دیگر به ویژه از یک گونه وحشی به یک گونه زراعی به منظور اصلاح گونه زراعی به شمار می‌رود. در واقع با تلاقیهای بین گونه‌ای ژرم‌پلاسم یک یا دو گونه گسترده تر شده و منابع ژنتیکی بیشتری به طور سهل الوصول در اختیار بهنژادگران قرار می‌گیرد. در یونجه دائمی تلاقیهای بین گونه‌ای متعددی صورت گرفته است که به نحو عمده به منظور انتقال صفاتی نظیر مقاومت در برابر تنشهای محیطی و حیاتی و نیز کارایی بهتر در استفاده از آب، تولید موادی خاص به منظور افزایش کیفیت علوفه تولیدی و نظایر آن بوده است. در یونجه دائمی به دلیل ناسازگارهای ژنتیکی موجود تلاقیهای بین گونه‌ای کمتر موفقیت آمیز بوده است. این مشکل به ویژه وقتی سطح پلوئیدی گونه‌های والدینی در تلاقی متفاوت باشد بیشتر می‌شود.

بعضی از گونه‌های یونجه یکساله به دلیل قابلیت تلاقی با یونجه دائمی (*M. sativa*) به عنوان منابع اصلاحی آن قلمداد گردیده‌اند. گونه‌های *M. M. media* *M. falcata* *glutinosa* از جمله گونه‌هایی هستند که این قابلیت را داشته و در مطالعات اصلاحی بکار گرفته شده‌اند (Lesins و Lesins, ۱۹۷۹).

یکی از دلایل انجام تلاقیهای بین و درون گونه ای انتقال مقاومت در برابر آفات و امراض از یک گونه به گونه دیگر است که تا کنون از این روش موفقیت‌های زیادی نیز حاصل گشته است. از جمله در تلاقی برگشتی رقمی از گونه *M. truncatula* به نام Cyprus با رقم دیگری به نام Caliph که توسط Lake (۱۹۹۳) انجام گردید دورگی حاصل شد که از نظر ویژگیهای زراعی مشابه رقم Cyprus می‌باشد، ولی در برابر شته *Acyrtosiphon kondoi* مقاوم است. به دلیل مقاومت در برابر این آفت، رقم Caliph در آزمایشی دو برابر رقم Cyprus بذر تولید نمود. زمانی که این دو رقم در معرض آلودگی به دو نوع شته قرار گرفتند تولید بذر در آنها به ترتیب ۷ و ۱۵۸ کیلوگرم در هکتار بر آورد گردید. در مقایسه با رقم دیگری به نام Paraggio نیز رقم Caliph علوفه و بذر بیشتری تولید نمود. Lake (۱۹۹۳) با استفاده از تلاقی برگشتی رقمی از گونه *M. truncatula* به نام Borung که به خاکهای خنثی و آهکی سازگاری مناسبی دارد، به عنوان والد دوره‌ای و انتخاب در میان نتاج به منظور کسب مقاومت در برابر شته‌های *Acyrtosiphon kondoi* و *Therioaphis trifolii* رقمی به نام Mogul آزاد نمود که به واسطه مقاومت در برابر این آفات ۳۰ درصد بیش از رقم Borung علوفه تولید نمود.

اخته کردن گله‌ها و انجام تلاقی: در یونجه یکساله به دلایل مختلف از جمله بسیار ریز بودن گله‌ها در زمان تلاقی و نیز حساس بودن آنها، انجام تلاقی کاری بسیار دشوار است که بر مشکلات ناشی از ناسازگاریهای قبل و بعد از تشکیل تخم^(۱) و سایر مشکلات این امر اضافه می‌گردد. چون که یونجه‌های یکساله به طور عام خودگشن بوده و از این طریق زمینه بسیار مناسبی در عدم موفقیت در انجام تلاقیهای بین گونه ای فراهم می‌شود، اخته کردن گله‌ها در زمان مناسب و قبل از اینکه کیسه گرده رسیده باشد و گرده‌ها آزاد شده

باشند یکی از نیازهای اساسی است. روشها و ابزار متفاوتی در اخته کردن گلهای یونجه یکساله پیشنهاد و به کار گرفته شده است. Pathipanawat و همکارانش، (۱۹۹۴) روشی ابداع کرده‌اند که به وسیله آن می‌توان تلاقیهای بین گونه ای و درون گونه ای به نسبت موفقی انجام داد. این روش نسبت به روشهای قبلی هم میزان تلاقیهای موفق بین گونه ای و هم مقدار تولید بذر را در هر غلاف افزایش می‌دهد.

جهت اجرای تلاقیهای بین گونه‌ای در گونه‌های مختلف جنس یونجه که تلاقی به روشهای معمول ممکن نیست دو روش عمده پیشنهاد شده است: ۱ - کشت جنین و تخمدان ۲ - تلاقی بین سلولهای رویشی^(۱). روش اول تنها در غلبه بر ناسازگاریهایی مناسب است که بعد از تشکیل تخم^(۲) ایجاد می‌شوند. این روش در تولید تعداد زیادی دورگ بین یونجه دائمی و سایر گونه‌های دائمی جنس مدیکاگو بکار گرفته شده است (McCoy, ۱۹۸۵, McCoy و Smith, ۱۹۸۶, Arcioni و همکاران، ۱۹۹۳). روش دوم نه تنها جهت غلبه بر ناسازگاریهای بعد از تشکیل تخم، بلکه جهت غلبه بر ناسازگاریهای قبل از تشکیل تخم^(۳) نیز کاربرد دارد. این روش در تولید دورگهای بین گونه‌ای زیادی حتی بین گونه‌های دیپلوئید و تتراپلوئید جنس مدیکاگو نیز بکار گرفته شده است (Arcioni و همکاران، ۱۹۹۳). بدیهی است انتخاب یکی از این روشها به نوع و میزان ناسازگاری بین گونه‌های مورد مطالعه بستگی دارد.

نتایج حاصل از تلاقی بین گونه‌ای: Arcioni و همکاران، (۱۹۹۳) با استفاده از روش تلاقی بین سلولهای رویشی توانستند دورگهای متعددی بین گونه‌هایی با سطوح مختلف کروموزومی با تعداد کروموزوم پایه یکسان و نیز با تعداد کروموزوم پایه غیر یکسان بدست آورند ($M. coerulea$ $2n=16$ با $M. sativa$ $2n=32$ و $M. arborea$ $2n=32$ با $M. sativa$ $2n=32$ و $M. sativa$ $2n=32$ با $M. rosgosa$ $2n=30$).

بنابراین اختلاف سطح پلوئیدی و تعداد کروموزوم پایه که یکی از سخت‌ترین موانع استفاده از تلاقیهای بین گونه‌های جنس مدیکاگو بود با استفاده از این روش برطرف گردید.

یکی از مشکلات و محدودیتهای یونجه یکساله حساسیت در برابر انواعی از شته است که موجب کاهش عملکرد آنها می‌گردد. در حالی که مقاومت در برابر این نوع شته‌ها در بعضی از گونه‌های یونجه یکساله وجود دارد و می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد. به منظور انتقال مقاومت در برابر آفات و امراض از گونه‌ای به گونه دیگر نیز تاکنون اقدام به انجام تلاقیهای بین گونه‌های مختلف یونجه یکساله گردیده است.

گلدهی و تولید بذر در یونجه‌های یکساله: رشد زایشی با شروع گلدهی آغاز می‌گردد و با تولید بذر خاتمه می‌یابد. درک عواملی که رشد زایشی را تحت تاثیر قرار می‌دهند در تولید بذر حد اکثر و نیز نگهداری تنوع ژنتیکی توده‌های مورد مطالعه اهمیت زیادی دارد. شناخت عواملی که رشد زایشی را تحت تاثیر قرار می‌دهند در تدوین راهبرد تولید در زمانی که تولید علوفه مورد نظر باشد نیز می‌تواند تاثیر زیادی داشته باشد، چراکه در این صورت به تاخیر انداختن مرحله گلدهی و تولید بذر یکی از عوامل موثر در تولید علوفه است. همین طور شناخت عوامل مذکور می‌تواند در تدوین راهبرد مناسب در انجام تلاقیهای بین گونه‌ای و درون گونه‌ای به منظور افزایش تنوع ژنتیکی و دامنه آن در گونه‌های مختلف یونجه یکساله بسیار مؤثر واقع گردد. عوامل متعدد محیطی و اثرات متقابل موجود میان آنها ممکن است در تعیین زمان گلدهی نقش داشته باشند.

نیازهای گلدهی: گیاه در مرحله مشخصی از رشد خود در پاسخ به فتو پریود و دما گل تولید می‌نماید. واکنش در برابر شرایط محیطی ممکن است میان گونه‌های مختلف و نیز توده‌های مختلف یک گونه متفاوت باشد و در گیاهان مرتعی نظیر یونجه یکساله ممکن است با شرایط محیطی که از آن منشا گرفته اند ارتباط زیادی داشته باشد. وقتی

این گیاهان به عنوان گیاهان یکساله زمستانه مورد کشت قرار گیرند گلدهی آنها تحت تاثیر اثرات متقابل دما و نور است (Russell و Clarkson، ۱۹۷۵). ارقام زود گل و نیز دیر گل در بسیاری از گونه‌های زراعی و غیر زراعی شناخته شده‌اند. تنوع ژنتیکی به نسبت زیادی بین و درون گونه‌های مختلف یونجه یکساله از نظر تاریخ شروع گلدهی مشاهده شده است (میرزایی ندوشن منتشر نشده).

عوامل مؤثر در افزایش دوره گلدهی و تولید بذر: گلدهی گونه‌های *M. littoralis* از *M. truncatula* و *M. rugosa* *M. polymorpha* با بهاره کردن^(۱) با طول روز بیش از ۱۴ ساعت، یک هفته کاهش یافت ولی گلدهی *M. scutellata* به این دو عامل بی تفاوت بود (Russell و Clarkson، ۱۹۷۵). Russell و Clarkson (۱۹۷۹) همچنین نشان دادند که افزایش دمای هوا از ۱۲ به ۲۴ درجه گلدهی رقم رایبسنسون از گونه *M. scutellata* و رقم Jemalong از گونه *M. truncatula* را بعد از پیش تیمار حرارتی ۱۴/۵ به ۱۱ درجه سانتیگراد حرارت روز و شب، گلدهی را یک هفته به جلو می‌اندازد. تنش آبی قبل از گلدهی در گونه‌های *M. littoralis* *M. polymorpha* و *M. truncatula* گلدهی را به تاخیر می‌اندازد (Russell و Clarkson، ۱۹۷۶).

Chaichi و همکاران، (۱۹۹۶) مقدار تولید بذر را در آزمایشهایی با تیمارهای مختلف چرایبی مورد بررسی قرار دادند. در این بررسیها ثابت شد که بیشترین تعداد غلاف بذری در کلیه تیمارهای چرایبی در اواسط نوامبر بدست می‌آید. در حالی که در چرای تاخیری^(۲) بیشترین تعداد غلاف در اوایل نوامبر تشکیل می‌شد. در این بررسی همچنین ثابت شد که به رغم کاهش نسبی تعداد غلافها در تیمارهای مختلف چرایبی ممتد تعداد بیشتری گیاهچه در فصل رویشی بعد در این تیمار ظاهر شدند.

میزان تولید بذر به عوامل متعددی از جمله گونه، واریته، شرایط اقلیمی، میزان

رطوبت قابل دسترس گیاه و تراکم بوته در واحد سطح بستگی دارد (Wallace و همکاران، ۱۹۹۵). میزان تولید بذر همین طور به فشار چرای دام، رقابت سایر گیاهان به ویژه گونه‌های گندمیان و حاصلخیزی خاک بستگی دارند. Tow، (۱۹۸۹) اثر تراکم کاشت، فشار چرای دام و حضور سایر گونه‌های گیاهی بر عملکرد یونجه‌های یکساله را در آزمایشی با تیمارهای مختلف برداشت و کشت آن در تناوب با غلات دانه ریز مورد بررسی قرار داده و به این نتیجه رسید که تیمارهایی که به کاهش عملکرد علوفه خشک یونجه یکساله منجر می‌شوند تولید گیاهچه را در فصل رویشی بعد نیز به شدت تحت تاثیر قرار می‌دهند. بدیهی است که این امر به دلیل عدم تقویت مناسب بانک بذر خاک در چنین شرایطی می‌باشد. در همین آزمایش با کاهش رقابت سایر گونه‌های گیاهی و استفاده از ازت جهت تقویت زمین و نیز کاهش فشار چرای دام، تولید گیاهچه و به عبارت دیگر زادآوری یونجه یکساله در فصل رویشی بعد بسیار مناسب بود. Clarkson، (۱۹۸۹) در مطالعات خود به این نتیجه رسید که شاخص برداشت بذر با ایجاد تنشهای محیطی در دوره گلدهی کاهش می‌یابد.

Ovalle و همکاران، (۱۹۹۳) ۵۱ نمونه از یونجه یکساله *M. polymorpha* را از نظر ویژگیهای مختلف از جمله مشخصات بذر و پدیده‌های فنولوژیکی مورد مطالعه قرار داده و به این نتیجه رسیدند که ارتباط نزدیکی میان ارتفاع محل جمع آوری نمونه‌ها و زمان گلدهی وجود دارد. به عبارت دیگر با افزایش ارتفاع محل رویش نمونه‌ها تاریخ گلدهی آنها نیز افزایش یافت. به علاوه اینکه نمونه‌هایی که غلافهای بدون خار داشتند زودتر به گل رفتند. این نوع نمونه‌ها بیشتر در مناطقی با بارندگی کم یافت می‌شدند.

یکی از ویژگیهای مهم یونجه‌های یکساله این است که وقتی به عنوان گیاه پوششی یا مخلوط با سایر گونه‌های گیاهی کاشته می‌شوند حتی وقتی در شرایط نوری نامناسب نیز قرار گیرند به اندازه کافی بذر تولید نموده بانک بذر خاک را از این نظر در وضعیت مطلوبی نگاه می‌دارند.

اهداف اجرای آزمایش: در یونجه‌های یکساله به لحاظ خودگشنی، حد اکثر درون زاد آوری (Inbreeding) وجود دارد و اغلب تنوع درون گونه‌ای و درون جمعیتی ناچیزی در نمونه‌های جمع آوری شده از طبیعت مشاهده می‌گردد. از این رو انجام تلاقیهای بین گونه‌ای و درون گونه‌ای به منظور ایجاد تنوع ژنتیکی و نیز انتقال ویژگیهای مطلوب از یک گونه به گونه دیگر در این گونه‌ها اهمیت زیادی دارد.

شناخت نحوه و زمان انجام تلاقیها از اموری است که به عنوان اولین گام در این مورد باید مورد توجه قرار گیرد. اینکه در چه زمانی گرده در گونه‌های مورد نظر آمادگی لازم را جهت رشد لوله گرده روی مادگی دارد و یا به عبارت دیگر در چه زمانی بدون اینکه تلقیح صورت گرفته باشد باید کیسه گرده را از گل خارج نمود، از جمله اهدافی است که در این تحقیق به آن پاسخ داده شده است.

نظر به اینکه گل و اندامهای زایشی در یونجه‌های یکساله بسیار ریز و حساس بوده و زمانی که گلها باز شوند، نسبت به شرایط نامناسب رطوبتی و حرارتی بسیار حساس هستند، بنابر این چگونه می‌توان بدون از دست دادن گل، نسبت به اخته کردن و تلقیح گل اقدام نمود نیز از جمله مواردی است که در این تحقیق به آن پرداخته شده است.

مواد و روشها

دو گونه از یونجه‌های یکساله به نامهای *M. rigidula* و *M. polymorpha* در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفتند. اولین نکته‌ای که باید در مورد انجام تلاقیهای بین و درون گونه‌ای لحاظ نمود، یافتن زمان آمادگی گرده جهت باروری مادگی گل بود. بدین منظور در زمانهای مختلف و نیز ابعاد متفاوتی از گل در گونه‌های مذکور، گلها در زیر بینوکولار رؤیت گردیده و پس از حصول اطمینان از اینکه کیسه گرده هنوز باز نشده است، اقدام به برداشتن کیسه گرده از گل گردیده و گرده‌های حاصل در محیط کشتی که مشتمل بر ۱۰٪ شکر و ۱٪ آگار بود کشت گردیدند تا نزدیکترین زمانی که گرده قادر به

رویش و ایجاد لوله گرده است بدست آید. با بدست آمدن اندازه و وضعیت گل در زمان رسیدگی گرده به روشهای متفاوتی نسبت به از بین بردن کیسه گرده در گلهای پایه مادری اقدام گردید.

۱ - تیمار الکل

الکل اتیلیک می تواند بافتهای گیاهی را از بین ببرد. شدت صدمه به بافتهای گیاهی به عواملی چون غلظت الکل، مدتی که بافت در معرض الکل قرار می گیرد و نیز ظرافت و حساسیت بافت به الکل، بستگی دارد. از این رو در صورتی که در یک گونه گیاهی بافتهای تشکیل دهنده مادگی گل نسبت به کیسه گرده مقاومت بهتری به الکل نشان دهد، در آن صورت می توان با استفاده از غلظت مناسبی از الکل، کیسه گرده را از بین برد بدون اینکه به مادگی صدمه ای برسد. به همین دلیل به منظور از بین بردن کیسه های گرده گلهای مورد نظر در زمان گلدهی ابتدا گلهایی که از اندازه مورد نظر بزرگتر گردیده بودند حذف و بعد انتهای ساقه حامل گلهای مورد نظر به مدتهای ۵/۰، ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ دقیقه در الکل اتیلیک با غلظتهای ۱۰، ۲۵ و ۴۰ درصد غوطه ور گردید تا غلظت مناسب الکل و نیز زمان مناسب در معرض الکل قرار گرفتن بدست آید. بعد از تیمار الکل به مدت زمانهای مورد نظر، ساقه در ظرف حاوی آب مقطر شستشو داده شد تا الکل اضافی موجود روی اندامها شسته شود. پس از دو روز به منظور بررسی اثر الکل، گلها مورد بازرسی قرار گرفتند.

۲ - برداشتن کیسه های گرده با استفاده از پنس و نیز دستگاه مکش

بوته هایی که شاخه های گلدار آنها به اندازه کافی رشد کرده و به حدی رسیده اند که به راحتی می توان آنها را در زیر بینو کولار مشاهده نمود (شکل شماره ۱) را انتخاب نموده و مطالعات در مورد آنها انجام گرفت. با توجه به این که رسیدگی کیسه گرده زمانی است که هنوز گلبرگها به طور کامل رنگ نگرفته و اندازه گل در هر دو گونه مورد بررسی

چیزی کمتر از دو میلیمتر است (شکل شماره ۲)، و به تبع آن کیسه‌های گرده به اندازه‌ای کوچک هستند که با چشم غیر مسلح قابل رؤیت نیستند، انجام این عمل به دقت و ظرافت زیادی نیاز دارد. به عبارت دیگر در این زمان به دلیل ریزی بیش از حد کیسه‌های پرچم برداشتن آنها و خارج کردنشان از گل بدون چشم مسلح ممکن نیست. در ضمن به دلیل ظرافت زیاد گل در این مرحله، گلها بسیار آسیب پذیرند. از این رو کلیه مراحل اخته کردن باید زیر بینوکولار و با نور طبیعی و با دقت زیادی انجام شود (شکل شماره ۳). ابتدا ساقه‌ای که گلپایی با ابعاد گفته شده دارد انتخاب شده و بعد کلیه گلها اعم از گلپایی باز شده و باز نشده و برگها موجود روی ساقه به جز یک برگ در نزدیکی گل مورد نظر حذف شدند. در ادامه در زیر بینوکولار با استفاده از چاقوی جراحی بسیار تیز و ظریف، گل از محل تا شدن گلبرگ استاندارد تا حدود نیم میلیمتر پایین‌تر از آن باز شد، به نحوی که کلاله مادگی گل صدمه‌ای نبیند. با باز شدن گل، کیسه‌های پرچم قابل رؤیت می‌شوند که با استفاده از نوک سوزن از گل خارج گردیدند. البته با استفاده از پمپ خلاء و لوله‌های شیشه‌ای که انتهای آنها به قطر حدود یک میلیمتر باشد نیز می‌توان با استفاده از نیروی مکش پرچمها را به طور مطمئن‌تر و راحت‌تر از گل خارج نمود. با خارج شدن کیسه‌های گرده و اطمینان از اینکه کیسه‌های پرچم در مرحله‌ای از رسیدگی نبوده‌اند که گرده‌ای آزاد نمایند، با استفاده از یک پنس ظریف کیسه‌گرفته رسیده از پایه پدری به روی مادگی گل اخته شده منتقل گردید و به آرامی تکان داده شد تا گرده‌ها روی کلاله مادگی ریخته شوند. کلیه این اعمال بهتر است در طول روز و پیش از ظهر صورت گیرند. بعد از گرده افشانی، انتهای ساقه را در داخل لوله آزمایش شیشه‌ای که بعد بر روی یک پایه مفتولی که کنار گلدان تعبیه شده بود ثابت می‌گردید (شکل شماره ۴)، قرار داده و دهانه شیشه با پنبه به آرامی مسدود گردید. پانزده روز بعد از کرده افشانی پنبه دهانه لوله‌ها را برداشته و روز هفدهم به طور کلی لوله‌های شیشه‌ای حذف گردیدند.

نتایج و بحث

به دلیل حساسیت زیاد کلالة و مادگی گلها موفقیت کافی در استفاده از الکل جهت از بین بردن کیسه گرده و اخته کردن گلها بدون اینکه به مادگی گل صدمه ای برسد حاصل نشد. یافتن مناسبترین زمان باز کردن گل و برداشتن پرچمها از جمله مواردی هستند که باید به آن توجه شود. در بیشتر گونه‌های یونجه یکساله زمانی که هنوز گلها بسیار ریز بوده و طول و عرضی حدود سه میلیمتر دارند مناسبترین زمان اخته کردن گلها محسوب می‌شود (دوگل سمت چپ شکل شماره ۲). در این زمان در گونه‌های مورد بررسی در این تحقیق گلبرگها هنوز از دندانه انتهایی کاسبرگها خارج نشده اند. به عبارت دیگر زمانی که گلبرگ موسوم به استاندارد به اندازه‌ای رشد نموده که هنوز از دندانه‌های کاسبرگ عبور نکرده و رنگ گلبرگها تازه رو به زردی گراییده است، مناسبترین زمان اخته کردن گلها محسوب می‌شود (شکل شماره ۵). با توجه به اینکه در گلهای بزرگتر از این حالت (شکل شماره ۶) کیسه گرده باز شده و گرده‌های کاشته شده در محیط کشت رشد نموده و لوله گرده تولید نموده‌اند (شکل شماره ۷) به طور قطع می‌توان استنباط نمود که گلهایی که گلبرگهای آنها رنگ گرفته و به وضوح قابل رؤیت هستند دیگر جهت انجام تلاقیهای بین و درون گونه‌ای مناسب نیستند. Pathipanawat و همکاران، (۱۹۹۴) در تجربیات خود مرحله‌ای را که گلبرگ استاندارد به اندازه‌ای رشد نموده که از دندانه کاسبرگ عبور نموده است مناسبترین مرحله اخته کردن گل در گونه‌هایی از یونجه یکساله قلمداد نموده‌اند. در این مطالعه مشاهده شد که به محض رسیدن به مرحله مذکور کیسه‌های گرده پاره شده و گرده در اختیار مادگی گیاه قرار می‌گیرد (شکل شماره ۶).

منابع

- Abdin, O., B. E. Coulman, D. Cloutier, M. A. Faris, XiaoMin Zhou, D. L. Smith, and X. M. Zhou, 1998. Yield and yield components of corn interseeded with cover crops. *Agronomy Journal*, 90: 63-68.
- Arcioni, S., F. Damiani, M. Piccirilli, and F. Pupilli, 1993. Embryo rescue and somatic hybridization for the production of interspecific hybrids in the genus *Medicago*. In: *Proceedings of the XVII International Grassland Congress, New Zealand, Australia*, 2: 1041-1042.
- Badaruddin, M. and D. W. Meyer, 1990. Green manure legume effects on soil nitrogen, grain yield, and nitrogen nutrition of wheat. *Crop Science*, 30: 819-825.
- Badaruddin, M. and D. W. Meyer, 1989. Water use by legumes and its effect on soil water status. *Crop Science*, 29: 1212-1216.
- Biederbeck, V. O., O. T. Bouman, J. Looman, A. E. Slinkard, L. D. Bailey, W. A. Rice, and H. H. Janzen, 1993. Productivity of four annual legumes as green manure in dryland cropping systems. *Agronomy Journal*, 85: 1035-1043.
- Biederbeck, V. O., and O. T. Bouman, 1994. Water use by annual green manure legumes in dryland cropping systems. *Agronomy Journal*, 86: 543-549.
- Ceciliani, F., A. Tava, R. Iori, M. Mortarino, M. Odoardi, and S. Ronchi, 1997. A trypsin inhibitor from snail medic seeds active against pest proteases. *Phytochemistry*, 44: 393-398.
- Chaichi, M.R., E.D. Carter, and P. G. Tow, 1996. Summer grazing management of medic pasture to ensure adequate dry

- residues and seed reserves. Proceedings of the 8th Australian Agronomy Conference, Toowoomba, Australia, : Australian Society of Agronomy Inc., 128-131.
- Chatterton, L. and B. Chatterton, 1996. Sustainable Dryland Farming: combining farmer innovation and medic pasture in a Mediterranean climate. Cambridge, UK, Cambridge University Press.
- Chriyaa, A., K. J. Moore, and S. S. Waller, 1997. Browse foliage and annual legume pods as supplements to wheat straw for sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 66: 85-96.
- Chriyaa, A., K. J. Moore, and S. S. Waller, 1997. Intake, digestion, and nitrogen balance of sheep fed shrub foliage and medic pods as a supplement to wheat straw. *Animal Feed Science and Technology*, 65: 183-196.
- Clarkson, N. M., 1989. Regression models to assess adaptation of annual medics (*Medicago* spp.) in semi-arid subtropical Australia. Proceedings of the XVI International Grassland Congress, Nice, France, Association Francaise pour la Production Fourragere, Centre National de Recherche Agronomique, 1535-1536.
- Clarkson, N. M. and J. S. Russell. 1976. Effect of water stress on the phasic development of two annual *Medicago* species. *Australian Journal of Agricultural Research*, 27: 227-234.
- Clarkson, N. M. and J. S. Russell, 1979. Effect of temperature on the development of two annual medics. *Australian Journal of Agricultural Research*, 30: 909-916.
- Clarkson, N. M. and J. S. Russell, 1975. Flowering responses to vernalization and photoperiod in annual medics (*Medicago*

- spp.). Australian Journal of Agricultural Research, 26: 831-838.
- Crawford, E. J, 1983. Selecting cultivars from naturally occurring genotypes: Evaluating annual *Medicago* species. In: McIvor, J. G., Bray, R. A. Genetic Resources of Forage Plants. Melbourne, Australia, CSIRO, 203-215.
- Crawford, E. J., A. W. H. Lake, and K. G. Boyce, 1989. Breeding annual *Medicago* species for semiarid conditions in southern Australia. Advances In Agronomy, 42: 399-437.
- Crawford, M. C., P. R. Grace, W. D. Bellotti, and J. M. Oades, 1997. Root production of a barrel medic (*Medicago truncatula*) pasture, a barley grass (*Hordeum leporinum*) pasture, and a faba bean (*Vicia faba*) crop in southern Australia. Australian Journal of Agricultural Research, 48: 1139-1150.
- Dalal, R. C., W. M. Strong, E. J. Weston, J. E. Cooper, K. J. Lehane, A. J. King, and C. J. Chicken, 1995. Sustaining productivity of a Vertisol at Warra, Queensland, with fertilisers, no-tillage, or legumes. 1. Organic matter status. Australian Journal of Experimental Agriculture, 35: 903-913.
- De Haan, R. L. and D. K. Barnes, 1998. Inheritance of pod type, stem color, and dwarf growth habit in *Medicago polymorpha*. Crop Science, 38: 1558-1561.
- Diwan, N., G. R. Bauchan, and M. S. McIntosh, 1994. A core collection for the United States annual *Medicago* germplasm collection. Crop Science, 34: 279-285.
- Frye, W. W., R. L. Blvins, S. J. Smith, S. J. Corak, and J. J. Varco, 1988. Role of annual legume cover crops in efficient use of

- water and nitrogen. In: Hargrove, W. L. Cropping strategies for efficient use of water and nitrogen. Madison: ASA, CSSA and SSSA, 129-154.
- Guldan, S. J., C. A. Martin, W. C. Lindemann, J. Cueto Wong, and R. L. Steiner, 1997. Yield and green-manure benefits of interseeded legumes in a high desert environment. *Agronomy Journal*, 89: 757-762.
- Lake, A. W. H, 1993. Register of Australian herbage plant cultivars. B. Legumes. 9. Annual medics. (a) *Medicago truncatula* Gaertn. (barrel medic) cv. Caliph. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 33: 821-822.
- Lesins, K. A. and I. Lesins, 1979. Genus *Medicago* (*Leguminosae*): A taxogenetic Study. The Netherlands, W. Junk by Publishers.
- McCoy, T. J, 1985. Interspecific hybridization of *Medicago sativa* L. and *Medicago rupestris* R.B. using ovule-embryo culture. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 27: 238-245.
- McCoy, T. J. and, L. Y. Smith, 1986. Interspecific hybrids of perennial *Medicago* species using ovule-embryo culture. *Theoretical and Applied Genetics*, 71: 772-783.
- Midmore, D. J, 1993. Agronomic modification of resource use and intercrop productivity. *Field Crops Research*, 34: 357-380.
- Mohammad, N. and I. A. Qamar, 1988. Dry matter yield, root nodulation and nitrogen fixation in 37 varieties of Australian annual medics. *Pakistanian Journal of Agricultural Research*, 9: 390-395.
- Moynihan, J. M., S. R. Simmons and C. C. Sheaffer, 1996. Intercropping annual medic with conventional height and

- semidwarf barley grown for grain. *Agronomy Journal*, 88: 823-828.
- Ovalle, C., J. Avendano, A. Delpozo and D. Crespo, 1993. Germplasm collection, evaluation and selection of naturalised *Medicago polymorpha* in the mediterranean zone of Chile. Proceedings of the XVII International Grassland Congress, New Zealand, Australia, 1: 222-223.
- Pathipanawat, W., R. A. C. Jones and K. Sivasithamparam, 1994. An improved method for artificial hybridisation in annual *Medicago* species. *Australian Journal of Agricultural Research*, 45: 1329-1335.
- Pathipanawat, W., R. A. C. Jones and K. Sivasithamparam, 1995. Studies on seed and pollen transmission of alfalfa mosaic, cucumber mosaic and bean yellow mosaic viruses in commercial cultivars and accessions of annual *Medicago* species. *Australian Journal of Agricultural Research*, 46: 153-165.
- Pathipanawat, W., R. A. C. Jones and K. Sivasithamparam, 1997. Factors influencing transmission of alfalfa mosaic virus through seed of annual medics (*Medicago* spp.) and the genetic control of seed transmission rate. *Australian Journal of Agricultural Research*, 48: 989-997.
- Quinlivan, B. J, 1971. Seed coat impermeability in legumes. *Journal of Australian Institute of Agricultural Science*, 37: 283-295.
- Roget, D. K, 1995. Decline in root rot (*Rhizoctonia solani* AG-8) in wheat in a tillage and rotation experiment at Avon, South Australia. *Australian Journal of Experimental Agriculture*,

35: 1009-1013.

- Rumbaugh, M. D. and D. A. Johnson, 1986. Annual medics and related species as reseeding legumes for northern Utah pastures. *Journal of Range Management*, 39: 52-58.
- Simon, J. P., 1964. Inheritance of three marker characters in *Medicago truncatula* Gaertn. (= *M. tribuloides* Desr). *Australian Journal of Agricultural Research*, 16: 31-36.
- Small, E. and M. Jomphe, 1988. A synopsis of the genus *Medicago* (*Leguminosae*). *Canadian Journal of Botany*, 67: 3260-3294.
- Smallwood, K. S., 1996. Managing vertebrates in cover crops: a first study. *American Journal of Alternative Agriculture*, 11: 155-160.
- Tang, C., L. Barton and C. Raphael, 1998. Pasture legume species differ in their capacity to acidify soil. *Australian Journal of Agricultural Research*, 49: 53-58.
- Tow, P. G. 1989. Monitoring annual *Medicago* ley pastures for management decisions. Proceedings of the XVI International Grassland Congress, 1989, Nice, Association Francaise pour la Production Fourragere, Centre National de Recherche Agronomique, Versailles, France, 601-602.
- Valizadeh, R., E. D. Carter and N. G. Yates, 1993. Voluntary intake and rumen degradation by sheep of mature pods of *Medicago truncatula* cv. Paraggio. Proceedings of the XVII International Grassland Congress, New Zealand, Australia, 1: 564-565.
- Wallace, A., P. M. Evans and D. Bowran, 1995. Effective barley grass (*Hordeum* spp.) control in annual medics with 2,2-DPA

- herbicide. Australian Journal of Experimental Agriculture, 35: 725-730.
- Weston, E. J., R. C. Dalal, W. M. Strong, K. J. Lehane, J. E. Cooper, A. J. King and A. Mohammad, 1996. Depletion and recharge of available soil water under three pasture leys and continuous wheat at Warra in Southern Queensland. Proceedings of the 8th Australian Agronomy Conference, Toowoomba, Queensland, Australia, : Australian Society of Agronomy Inc. 578-581.
- Zhu, YanPing, C. C. Sheaffer, D. K. Barnes and Y. P. Zhu, 1996. Forage yield and quality of six annual *Medicago* species in the north central USA. Agronomy Journal, 88: 955-960.



شکل شماره ۱- وضعیت عمومی بوته مورد استفاده در انجام مراحل برداشتن کیسه گرده از داخل گل



شکل شماره ۲: گل در یونجه یکساله (*M. polymorpha*)، در مراحل متفاوتی از رسیدگی. در دو گل سمت چپ کیسه‌های گرده هنوز به طور کامل نرسیده و دانه گرده در آنها قادر به تلقیح مادگی گل نیستند. از این رو گل در یونجه‌های یکساله در این مرحله، مناسب برداشتن کیسه گرده می‌باشد.



شکل شماره ۳- استفاده از بینوکولار جهت مشاهده اندامهای مختلف گل در یونجه یکساله و برداشتن کیسه‌های گرده



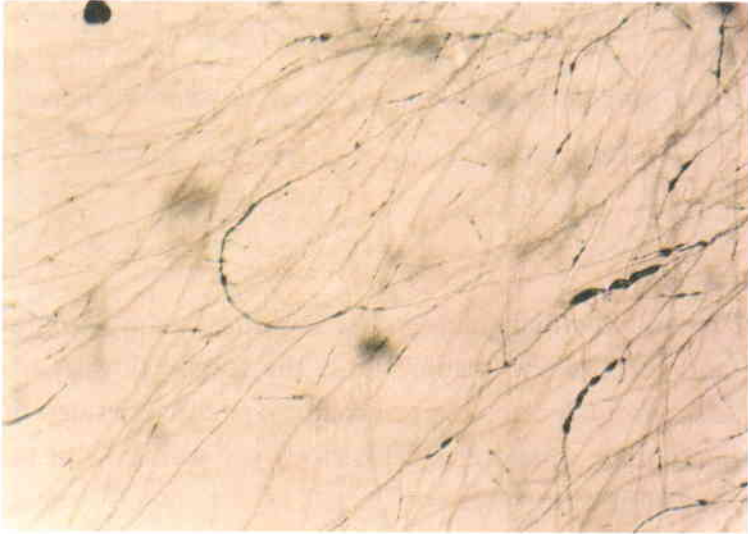
شکل شماره ۴- قرار گرفتن گل‌های تلقیح شده در لوله‌های آزمایش شیشه‌ای، بسته شدن دهانه لوله‌ها با استفاده از پنبه و تثبیت لوله‌های آزمایشی روی پایه‌های میله‌ای به مدت ۱۵ تا ۱۷ روز.



شکل شماره ۵- کیسه‌های گرده و مادگی گل در یونجه یکساله *M. polymorpha* در زمان مناسب جهت برداشتن کیسه گرده و اخته کردن گل‌های پایه مادری در تلاقیهای بین و درون گونه ای.



شکل شماره ۶: گل یونجه یکساله *M. rigidula* در مرحله‌ای که گلبرگها به اندازه‌ای رشد نموده‌اند که از انتهای دندان‌های کاسبرگها خارج شده‌اند. در این مرحله کیسه‌های گرده به طور کامل رسیده و دانه‌های گرده قادر به تلقیح مادگی گل هستند.



شکل شماره ۷- رشد دانه‌گرده در محیط کشت و تشکیل لوله‌گرده در گرده‌های رسیده که قادر به تلقیح گل هستند.

Regeneration and interspecific hybridization in annual *Medicago species*

*Hossein Mirzaie-Nodoushan, Research Institute of Forests and
Rangelands, P.O.Box 13185-116, Tehran, Iran.*

Abstract:

When and at which stage in Medics' flowers, pollen grains may grow and fertilize the pistil? How the fragile flowers of medics may be emasculated for inter and intra-specific hybridization, with high percentage of success? This study was carried out to answer these questions.

To find the exact time of pollen maturation and their fertility, the flowers of two species of medics, *Medicago polymorpha* and *M.rigidula* were visited at various sizes and stages. Pollen sacs were removed and cultured on agar based media. The best size of the flowers for emasculation before self fertilization was recognized for the two species. This size was about the stage before the tip of the standard petal past its calyx teeth.

To emasculate the flowers on the mentioned stage, various density of ethilic alcohol, suction pump, surgical blade and fine needle were used. The best method to emasculate the flowers was opening the flowers through standard petal by surgical blade and removing the pollen sacs by suction pump or fine needle. After hybridization, to cover the fragile emasculated flowers to keep them fresh and moist, a glass tube was used, instead of paper bag, for 15 days at 25 degree of centigrade.

Keywords: Pollen sac, Annual medicago species, Interspecific hybridization, *Medicago polymorpha*, *M.rigidula*