مقاله پژوهشی

نشریه علمی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/IJRFPBGR.2022.359300.1424
جلد ۳۰، شماره ۲، صفحه ۲۱۰-۱۹۲ (۱۴۰۱) شناسه دیجیتال (DOR): 20.1001.1.17350891.1401.30.2.3.9

# مطالعه‌ی اکولوژیکی، میکرومورفولوژیکی و مولکولی گونه‌های یونجه (*Medicago* L.) در اکوسیستم‌های مرتعی استان گلستان

**قربانعلی گرایلو[۱]، ابوالفضل طهماسبی[۲]*، الهام امینی[۳] و بهاره بهمنش[۴]**

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس

۲- نویسنده مسئول، استادیار، گروه مرتع و آبخیزداری، دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس

پست‌الکترونیک: ab_tahmasebi@gonbad.ac.ir

۳- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس

۴- استادیار، گروه مرتع و آبخیزداری، دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۴/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۹/۹

## چکیده

به منظور شناخت خصوصیات بوم‌شناختی، ریزریخت‌شناسی و مولکولی شش گونه از جنس یونجه (*Medicago* L.) این تحقیق از طریق شناسایی مناطق رویشگاهی، ویژگی‌های رویشی گونه ها و خصوصیات خاک رویشگاهی (عمق ۰ تا ۳۰ سانتی‌متری) انجام پذیرفت. ریخت‌شناسی دانه گرده این گونه‌ها نیز توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) مورد بررسی قرار گرفت. بررسی روابط مولکولی بین شش گونه *یونجه* بر اساس توالی‌های هسته‌ای nrDNA ITS و کلروپلاستی rpl32-trnL(UAG) انجام گرفت. نتایج اکولوژیک نشان‌دهنده آن بود که اکثر گونه های یونجه در منطقه مورد مطالعه در اقلیم خشک تا نیمه‌خشک و در خاک های سیلتی، سیلتی کلی و سیلتی کلی لوم حضور داشتند. بررسی‌ها نشان داد که اندازه بسیاری از دانه‌های گرده مورد مطالعه، متوسط و از نوع سه شیار روزن و به ندرت چهار تا شش شیاری بودند. نتایج مطالعات مولکولی بیانگر این بود که همه گونه های مورد بررسی یک گروه تک‌نیا با حمایت بالا را تشکیل می‌دهند. گونه چندساله *M. sativa* در کلادی مجزا در مجاورت گونه‌های یکساله قرار گرفتند که نشان‌دهنده‌ی تک‌نیا بودن گونه‌های یکساله می‌باشد. نتایج این تحقیق نشان‌دهنده کارآیی نشانگرهای مولکولی در تعیین قرابت و خویشاوندی تاکسون‌ها در سطح گونه می‌باشد و می‌تواند به عنوان ابزار مکمل در شناسایی تاکسونومیک گونه‌های جنس یونجه استفاده گردد.

**واژه‌های کلیدی:** دانه گرده، بوم‌شناختی، *Medicago*، نشانگر هسته‌ای، نشانگر کلروپلاستی..

## مقدمه

اکوسیستم‌های مرتعی حدود ۵۳٪ از سطح کشور را شامل می‌شوند. پوشش گیاهی این اکوسیستم‌ها دربرگیرنده گونه‌های مختلف است که از نظر ارزش دارویی، علوفه‌ای، صنعتی و نیز حفاظت خاک اهمیت دارند. مدیریت و بهره‌برداری درست از مراتع نیازمند شناسایی ویژگی‌های

گونه‌های اصلی تشکیل‌دهنده مراتع است. شناخت این خصوصیات می‌تواند در بهره‌برداری اصولی از مراتع و استمرار تولید آن نقش مهمی داشته باشد.

استان گلستان از لحاظ پوشش گیاهی بسیار متنوع بوده و به‌دلیل جایگاه جغرافیایی ویژه خود آب و هوای گوناگونی دارد. نیمه شمالی استان، بخش نیمه‌خشک و خشک از بارندگی کمی برخوردار است. دانش نیازهای اکولوژیک گونه‌های مرتعی به‌ویژه در مناطق خشک برای برنامه‌ریزی و مدیریت جوامع گیاهی و حفاظت و بهره‌برداری از اکوسیستم‌های مناطق خشک بسیار اهمیت دارد. تدوین و اجرای برنامه‌های مؤثر در راستای احیاء، حفاظت و بهره‌برداری سودمند از گونه‌های گیاهی فقط با شناخت خصوصیات و نیازهای اکولوژیک آنها امکان‌پذیر است (Valizadeh, 2015). مطالعات نشان داده که در مناطق بیابانی و خشک، ویژگی‌های بافت خاک و هدایت الکتریکی نقش بیشتری در پراکنش پوشش گیاهی دارند. این ویژگی‌ها بر رطوبت قابل دسترس و جذب مواد غذایی خاک توسط گیاهان تأثیرگذارند (Zare Chahoki *et al*., 2007). اطلاع از وضعیت تنوع ذخایر زیستی و روابط فیلوژنی گونه‌ها گام اولیه و اساسی در به‌نژادی و مدیریت آنهاست (Zolali, Farsi & 2004). در حال حاضر شناسایی و بررسی گیاهان به طور گسترده‌ای با استفاده از نشانگرهای مولکولی انجام می‌شود.

یونجه *Medicago* L. (Fabaceae) یکی از مهمترین گیاهان علوفه‌ای و مرتعی تیره بقولات است که دامنه وسیعی از سازگاری را نشان می‌دهد و در سرتاسر دنیا کشت می‌شود. یونجه بیش از ۶۰ گونه در دنیا دارد که ۱۶ گونه آن در ایران شناسایی شده و در بیشتر نقاط ایران رویش دارند، به‌طوری‌که ۱۴ گونه آن یکساله هستند (Hanteh & Zare Chahoki, 2012).

کشور ایران از بزرگ‌ترین مراکز تنوع جنس یونجه به‌شمار می‌آید و به‌دلیل داشتن شرایط اقلیمی متنوع از نظر تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای بسیار اهمیت دارد. بیشترین پراکنش و تنوع گونه‌های یونجه در بخش‌های شمال‌غرب، غرب و جنوب کشور و در امتداد رشته کوه‌های زاگرس و در نواحی با اقلیم مدیترانه‌ای است. ازاین‌رو، استان‌های شرقی کشور تنوع بسیار کمی از لحاظ پراکنش گونه‌های این سرده دارند. محدوده ارتفاع پراکنش گونه‌ها نیز از کمتر از صفر تا ۲۷۵۰ متر می‌باشد و این بیانگر عرصه وسیع انتشار گونه‌های این سرده در ارتفاعات مختلف از سطح دریاست. گیاهان این سرده بیشتر به صورت یکساله یا چندساله، دارای ریشه راست و جانبی، ساقه چهارگوش با کرک‌های غده‌ای، گل‌ها به رنگ بنفش تیره یا زرد و گل‌آذین خوشه مرکب دیده می‌شود. داشتن یک سیستم ریشه‌ای قوی، عامل موفقیت این گیاه و مقاومت در برابر کلیه عوامل نامساعد و استفاده از مواد غذایی نقاط مختلف خاک به حساب می‌آید.

تحقیقاتی که در جهان انجام شده ویژگی‌های مورفولوژیکی، سازگاری، اگرونومیکی و ایزوآنزیمی الگوی پراکنش جمعیت‌های وحشی یونجه بررسی شده است (Prosperi *et al*., 2006; Ronfort *et al*., 1998; Jenczewski *et al*., 1999). مطالعاتی که با استفاده از روش‌های مبتنی بر DNA شامل SSR، SRAP، AFLP، ISSR و RAPD در یونجه انجام شده نیز موفقیت‌آمیز بوده است (Tucak *et al*., 2008; Segovia-Lerma *et al*., 2003; Xavier *et al*., 2011). در کشور ایران تحقیقات انجام شده بر روی ارقام زراعی یونجه متمرکز هستند (Falahati Anbaran *et al*., 2005; Jafari & Goodarzi, 2007; Noeparvar *et al*., 2008; Fareghi *et al*., 2007; Shariat, 2001; Darvishi Zeidabadi *et al*., 2000; Koochaki & Vahbkhaki, 1985)

بااین‌حال، بر روی جمعیت‌های وحشی یونجه در ایران مطالعات اندکی انجام شده است. Salehi و همکاران (۲۰۱۰) تنوع ژنتیکی جمعیت‌های وحشی ایرانی یونجه را بر اساس پروتئین‌های کل و تعیین ارتباط آن با عوامل اکولوژیکی بررسی کردند و نشان دادند که تنوع بالایی در ویژگی‌های مختلف این گیاه وجود دارد، به‌طوری‌که در برنامه‌های به‌نژادی یونجه می‌بایست تنوع ژنتیکی ارقام یونجه به وسیله استفاده از والدین مختلف افزایش یابد.

Bayat و همکاران (2021a) تقسیم‌بندی جغرافیایی نواحی تماس گونه اروپایی *M. rigidula* و نزدیکترین گونه آسیایی آن *M. rigiduloides* در ایران را توسط ویژگی‌های مورفولوژیک و ناحیه فاصله‌انداز داخلی (ITS) بررسی کردند. نتایج این بررسی نشان داد که پراکندگی گونه *M.rigidula* در منطقه خزری و گونه *M. rigiduloides* به طور گسترده در غرب و مرکز ایران امتداد یافته است. این محققان همچنین به مطالعه تنوع ژنتیکی و مورفولوژیکی جمعیت‌های این دو گونه پرداختند (Bayat *et al*., 2021b). مطالعه گیاه یونجه در سوریه و عراق نشان داد که پراکنش گونه‌ها همبستگی قابل ملاحظه‌ای با تنوع شرایط خاکی و اقلیمی دارد (Radwan *et al*., 1978; Moneim & Cocks, 1986). در بررسی‌های دیگر، مشخص شد که دو عامل خاک و اقلیم بر پراکنش یونجه مؤثر هستند، به‌طوری‌که خصوصیات خاک اثر بیشتری نسبت به عوامل اقلیمی دارد (Bounejmate *et al*., 1992). در تحقیق دیگری Smallو همکاران (۱۹۸۱) تنوع گرده در جنس *Medicago* را بررسی و به ناهمگون بودن صفات گرده در این جنس اشاره کردند. Moore و همکاران (۱۹۹۱) به سه شیاری بودن دانه گرده از جنس یونجه اشاره کرده‌اند و برخی گونه‌های این جنس را تحت عنوانType *Trifolium* معرفی نموده‌اند. Ghanavati و همکاران (۲۰۰۷) به بررسی ریخت‌شناسی دانه گرده در این سرده در ایران پرداختند و نشان دادند که دانه گرده عمدتاً از نوع سه شیار روزن‌دار و به‌ندرت ۴ تا ۶ شیاری است.

از آنجایی که در ارتباط با بررسی خصوصیات اکولوژیکی و به‌ویژه خصوصیات مولکولی این گونه تحقیقات اندکی در کشور انجام شده، ازاین‌رو در این مطالعه به بررسی خصوصیات بوم‌شناختی، میکرومورفولوژیکی و مولکولی گونه‌های مختلف یونجه به عنوان یکی از مهمترین گیاهان علوفه‌ای و مرتعی مرغوب با دامنه وسیعی از سازگاری و خصوصیات منحصربفرد از نظر ارزش غذایی و خوشخوراکی و هضم‌پذیری بالا برای دام و به عنوان گزینه‌ای مناسب برای اصلاح و احیای مراتع منطقه پرداخته شده است.

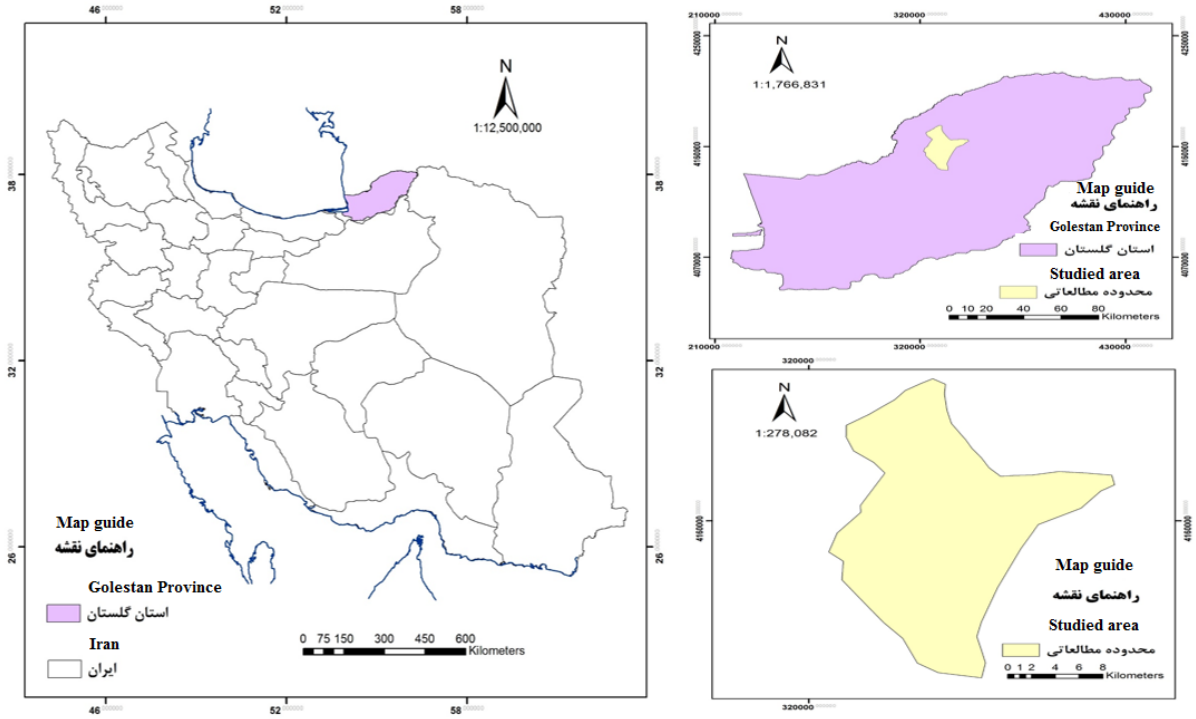
## مواد و روش‌ها

تهیه و جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی

در این بررسی، ۱۲ جمعیت از شش گونه *Medicago* در ایران در محدوده مراتع شمال شهرستان گنبدکاووس در استان گلستان بررسی شد (جدول ۱). این جمعیت‌ها از زیستگاه‌های مختلف جمع‌آوری (شکل ۳) و با مراجعه به فلور رنگی قهرمان، فلورا ایرانیکا (Rechinger, 1984) و Mehregan و همکاران (۲۰۰۲) شناسایی شدند. کلیه نمونه‌های بررسی شده، در مرکز هرباریوم دانشگاه گنبدکاووس نگهداری می‌شوند. در این مطالعه به بررسی خصوصیات اکولوژیکی، میکرومورفولوژیکی و مولکولی گونه‌های مختلف یونجه پرداخته شده است که در ذیل به تفکیک به آنها اشاره می‌گردد.

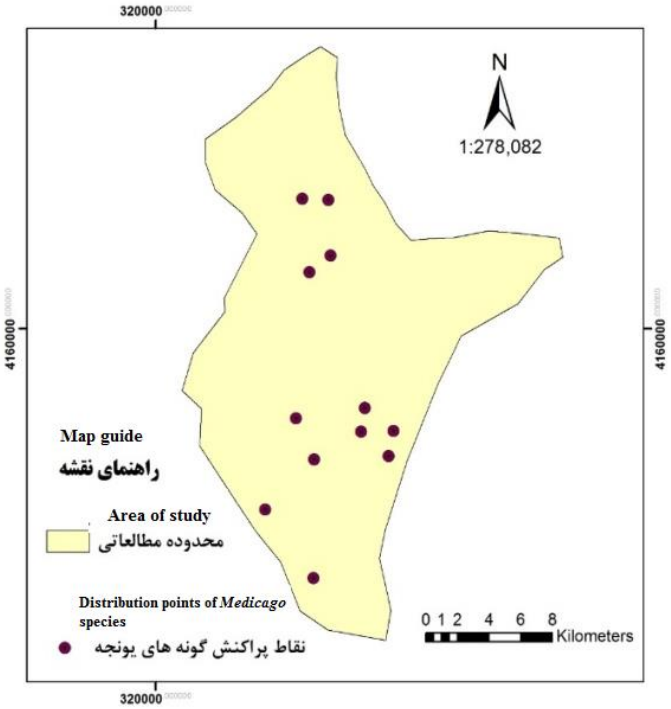
منطقه مورد مطالعه

وسعت منطقه مورد مطالعه حدود ۳۹/۹ هزار هکتار که بخشی از مراتع شمال استان گلستان است و در محدوده مراتع شهرستان گنبدکاووس می‌باشد (شکل‌های ۱ و ۲). با توجه به اطلاعات مربوط به بارندگی و درجه حرارت، اقلیم این منطقه جزو مناطق نیمه‌خشک است. بارش منطقه عمدتاً به‌صورت باران و به‌ندرت به صورت برف می‌باشد. متوسط بارندگی سالیانه این مناطق در حدود ۳۱۰ میلیمتر بوده و میزان میانگین دمای سالیانه حدود ۱۸/۵ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. تعداد روزهای یخبندان در سال به طور متوسط حدود ۱۶ روز به ثبت رسیده است و زمان آن محدوده‌ای بین آذر تا اواخر اسفندماه می‌باشد. متوسط سالیانه رطوبت نسبی منطقه حدود ۶۸ درصد است.



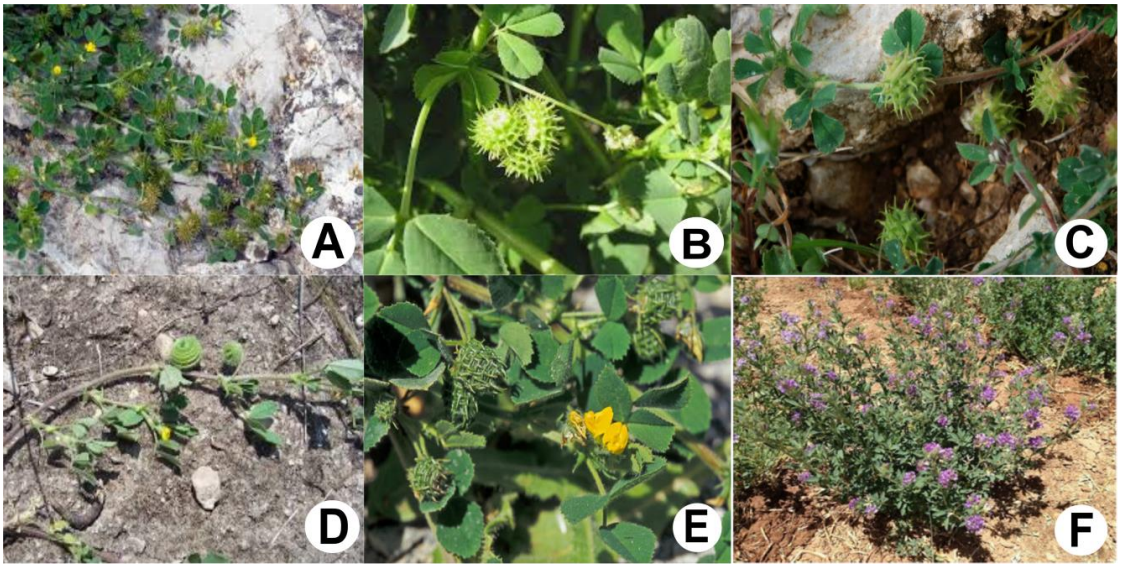

شکل ۱- منطقه مطالعاتی در کشور و استان

**Figure 1- The study area in the country and province**




شکل ۲- پراکنش مناطق جمع‌آوری گونه‌های مختلف یونجه در محدوده مطالعاتی

**Figure 2- Distribution of collection areas of different types of *Medicago* in the study area**




شکل ۳- تصویر گونه‌های مورد مطالعه ***Medicago***

**Figure 3- The studied species of *Medicago***
**A: *M. minima*, B: *M. polymorpha*, C: *M. rigidula*, D: *M. scutellata*, E: *M. truncatula*, F: *M. sativa***

جدول ۱- لیست گونه‌های مورد بررسی در این مطالعه

**Table 1. List of the investigated species in this study**

| گونه<br>**Species** | محل جمع‌آوری<br>**Locality** | جمع‌آوری کننده<br>**Collector** | شماره هرباریومی<br>**Voucher no.** | شماره ژن بانک<br>**GenBank accession no. ITS/rpl32-trnL$_{UAG}$** |
|---|---|---|---|---|
| *Medicago minima* | Gonbad Kavous | Gerailou | 807322-GKUH | OP763659/ OP777913 |
| *M. minima* | Gonbad Kavous | Gerailou | 807328-GKUH | - |
| *M. polymorpha* | Gonbad Kavous | Gerailou | 807323-GKUH | OP763660/ OP777914 |
| *M. polymorpha* | Gonbad Kavous | Gerailou | 807329-GKUH | - |
| *M.rigidula* | Gonbad Kavous | Gerailou | 807324-GKUH | OP763661/ OP777915 |
| *M.rigidula* | Gonbad Kavous | Gerailou | 807330-GKUH | - |
| *M.scutellata* | Gonbad Kavous | Gerailou | 807325-GKUH | OP763662/ OP777916 |
| *M.scutellata* | Gonbad Kavous | Gerailou | 807331-GKUH | - |
| *M.truncatula* | Gonbad Kavous | Gerailou | 807326-GKUH | OP763663/ OP777917 |
| *M.truncatula* | Gonbad Kavous | Gerailou | 807332-GKUH | - |
| *M.sativa* | Gonbad Kavous | Gerailou | 807327-GKUH | OP763664/ OP777918 |
| *M.sativa* | Gonbad Kavous | Gerailou | 807333-GKUH | - |

**مطالعه اکولوژیکی**

برای بررسی اکولوژیکی گونه‌های مورد نظر اطلاعات جامعی از هر محل که شامل تاریخ جمع‌آوری، طول و عرض جغرافیایی، گونه‌های همراه، ویژگی‌های ریختی یادداشت و اطلاعاتی مانند میانگین دما و بارندگی سالانه و درجه حرارت متوسط طی یک دوره زمانی بر اساس گزارش‌های سازمان هواشناسی کشور ثبت شد و مشخصات و نوع خاک و اقلیم مناطق پراکنش گونه‌ها به آن اضافه گردید و بعد اطلاعات اکولوژیکی بدست آمده مورد سازمان‌دهی و تحلیل قرار گرفت. از آنجا که بیشتر تغییرات خصوصیات خاک در خاک سطحی رخ می‌دهد نمونه‌برداری از عمق ۰-۳۰ سانتی‌متری انجام شد. برای تجزیه‌وتحلیل

اطلاعات حاصل از مطالعات اکولوژیکی، نمونه‌های برداشت شده در عرصه به آزمایشگاه منتقل شده و پارامترهای بافت و pH خاک آن مشخص شد. نقشه مرتبط با مناطق جمع-آوری گونه‌ها با استفاده از نرم‌افزار GIS 10.2 ترسیم گردید.

**مطالعات گرده‌شناسی**

برای مشاهده با میکروسکوپ نوری از روش استولیز (Erdtman, 1952) استفاده گردید. پس از استولیز با میکروسکوپ نوری Nickon مدل E100 و بزرگنمایی ۴۰ و ۱۰۰ از ۳۰-۲۰ گرده از نمای قطبی و استوایی با دوربین دیجیتال Canon (مدل ۶۳a و ۸ مگاپیکسل) عکس‌برداری شد. به منظور مطالعه و تهیه میکروگراف-های الکترونی، دانه‌های گرده مناسب با استفاده از میکروسکوپ الکترونی SEM مدل //VEGA TESCAN-LMU تحت ولتاژ 22KV در مرکز پژوهشکده رازی تهران بررسی و تصویربرداری شدند. برای اندازه‌گیری، به‌طور میانگین ۳۰ گرده از هر جمعیت، با میکروسکوپ نوری Nickon مدل E100 با دوربین دیجیتال Canon (مدل ۶۳a و ۸ مگاپیکسل) عکس-برداری و با استفاده از نرم‌افزار Image Tools اندازه-گیری‌ها انجام شد. صفات طول محور قطبی (P)، طول محور استوایی (E)، نسبت P/E، ضخامت و نوع تزئینات اگزین ارزیابی گردید. میانگین و انحراف معیار نیز توسط نرم‌افزار Minitab 14 محاسبه شد. برای تعیین اندازه و شکل گرده از طبقه‌بندی ارتمن (Erdtman, 1943) و برای واژه‌شناسی از سایت معتبر گرده‌شناسی Paldat (Halbritter *et al*., 2018) استفاده شده است.

**مطالعات مولکولی**

در مجموع شش گونه *Medicago* به عنوان درون‌گروه و یک گونه *Ononis mittisima* .L نیز بر اساس مطالعات مولکولی پیشین (Ellison *et al*., 2006) به عنوان برون‌گروه در این مطالعه آنالیز شدند تا روابط فیلوژنتیک میان آنها بررسی شده و در ارتباط با جایگاه آرایه‌شناختی آنها اظهارنظر دقیق‌تری انجام شود.

**استخراج DNA، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و توالی‌یابی**

DNA کل ژنوم از برگ‌های خشک شده نمونه‌های هرباریومی استخراج شد. روش استخراج بر مبنای روش کیت استخراج DNA گیاهی شرکت تیان ژن چین ( DNA secure Plant Kit) است. در این تحقیق، از توالی ناحیه nrDNA ITS ژنوم هسته‌ای و rpl32-trnL$_{(UAG)}$ کلروپلاستی برای ارزیابی فیلوژنتیک آرایه‌های مطالعه شده، استفاده شد. به منظور انجام واکنش PCR از آغازگرهای ITS4 و ITS5 (White *et al*., 1990) و کلروپلاستی *rpl*32-*trn*L$_{(UAG)}$ استفاده شد. توالی آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۲ ارائه شده است. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از برنامه بهینه شده با آغازگر مورد نظر و دستگاه‌های ترموسایکلر ( Eppendorf, Germany; Astec, Japan) دارای ۹۶ چاهک انجام شد. پس از اطمینان از صحت PCR و تکثیر قطعه مورد نظر به کمک الکتروفورز روی ژل آگارز، تک باندهای قوی (۲۰ نانوگرم) و فاقد باند اضافی و کشیدگی به منظور تعیین توالی به شرکت ژنتیک کدون ارسال شدند.

**جدول ۲- توالی آغازگرهای استفاده شده برای واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز**

**Table 2. Sequence of primers used for polymerase chain reactions**

| توالی‌ها<br>**Sequences** | آغازگر<br>**Primer** | درجه حرارت<br>**Tm** |
|---|---|---|
| 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG -3' | ITS5 | 54 ºC |
| 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' | ITS4 | |
| 5'–CAGTTCCAAAAAAACGTACTTC–3' | rpl32 | 54 ºC |
| 5'–CTGCTTCCTAAGAGCAGCGT–3' | *trn*L$_{(UAG)}$ | |

### آنالیزهای فیلوژنتیک

در ابتدا کروماتوگرام‌های حاصل از تعیین توالی نمونه‌ها، با استفاده از نرم‌افزار Bioedit ویرایش شده، سپس توالی‌های مورد اشاره با استفاده از نرم‌افزار Clustal X (Larkin *et al.*, 2007) هم‌ردیف شدند. آنگاه ماتریس داده‌های هم‌ردیف‌سازی شده برای قطعه DNA مورد نظر، به کمک نرم‌افزار MrBayes نسخه ۳/۱۲ (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) بررسی و تحلیل گردیدند. برای انجام آنالیز فیلوژنی بر اساس روش Bayesian، با استفاده از برنامه MrModeltest، نسخه ۲/۳ و بر اساس معیار اطلاعاتی AIC (Akaike Information Criterion)، مدل‌های تکاملی مناسب برای داده‌های مورد نظر انتخاب شد (Posada & Buckley, 2004). طبق این آزمون، مدل SYM+I+G برای توالی nrDNA ITS و مدل GTR+G برای توالی *rpl*32-*trn*L(UAG) و مدل GTR+I+G برای داده‌های ترکیبی هسته‌ای و کلروپلاستی انتخاب شده و با استفاده از برنامه MrBayes نسخه ۳/۱۲ آنالیزهای فیلوژنتیک انجام شد. حمایت شاخه‌ها در روش Bayesian با اعداد مربوط به احتمال پسین بیان می‌شود. برای آنالیز داده‌ها به روش بیشینه درست‌نمایی (Maximum Likelihood) از برنامه raxmlGUI (Silvestro & Michalak, 2012) نسخه ۱,۳ و به روش بیشینه صرفه‌جویی از برنامه PAUP (Swofford, 2002) نسخه 4.0a157 استفاده شد.

**جدول ۳- مناطق انتشار، اقلیم و خاک گونه‌های مختلف *Medicago* در منطقه مورد مطالعه**

**Table 3. Distribution areas, climate and soil of different *Medicago* species in the study area**

| گونه | طول جغرافیایی | عرض جغرافیایی | بارندگی سالیانه | دما | اقلیم | نوع خاک | اسیدیته خاک |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Taxon** | **Longitude** | **Latitude** | **rainfall** | **Temp.** | **Climate** | **Soil Type** | **pH** |
| *M. rigidula* | 32°68’60" | 41°48’55" | 310.1 | 5-35.9°C | خشک تا نیمه‌خشک | سیلتی، سیلتی لوم، سیلتی کلی لوم | 7.5-7.9 |
| *M. rigidula* | 32°66’59" | 41°44’53" | 310.1 | 5-35.9°C | Dry to semi-dry<br>خشک تا نیمه‌خشک | Silty, silty loam , silty clay loam<br>سیلتی لوم تا سیلتی کلی لوم | 7.3-7.7 |
| *M.polymorpha* | 33°10’46" | 41°64’51" | 341 | 6-34.4°C | Dry to semi-dry<br>خشک تا نیمه‌خشک | Silty loam to silty clay loam<br>سیلتی لوم تا سیلتی کلی و سیلتی کلی لوم | 8-8.3 |
| *M.polymorpha* | 33°13’42" | 40°62’52" | 341 | 6-34.4°C | Dry to semi-dry<br>خشک تا نیمه‌خشک | Silty, silty loam, silty clay loam<br>سیلتی لوم تا سیلتی کلی لوم | 8.1-8.5 |
| *M. minima* | 32°92’58" | 41°68’28" | 173.3 | 1-35.9°C | Dry to semi-dry<br>خشک تا نیمه‌خشک | Silty loam to silty clay loam<br>کلی لوم | 8.1-8.5 |
| *M. minima* | 33°12’41" | 41°62’13" | 173.3 | 1-35.9°C | Dry to semi-dry<br>خشک تا نیمه‌خشک | Clay loam<br>کلی لوم | 8.3-8.7 |
| *M. truncatula* | 32°69’12" | 41°48’54" | 250 | 3-34.8°C | Dry to semi-dry<br>خشک تا نیمه‌خشک | Clay loam<br>سیلتی لوم تا سیلتی کلی | 8-8.3 |
| *M. truncatula* | 33°76’10" | 41°39536 | 250 | 3-34.8°C | Dry to semi-dry<br>خشک تا نیمه‌خشک | Silty loam to silty clay<br>سیلتی لوم تا سیلتی کلی | 8.5-8.7 |
| *M. scutellata* | 32°99’68" | 41°44’60" | 310.1 | 5-35.9°C | Dry to semi-dry<br>نیمه‌خشک | Silty loam to silty clay<br>سیلتی لوم تا سیلتی کلی | 7.6-8.3 |
| *M. scutellata* | 32°99’68" | 41°44’60" | 310.1 | 5-35.9°C | Semi-dry<br>نیمه‌خشک | Silty loam to silty clay<br>سیلتی لوم تا سیلتی کلی | 7.5-8.1 |
| *M. sativa* | 32°69’76" | 41°48’80" | 310.1 | 5-35.9°C | Semi-dry<br>نیمه‌خشک | Silty loam to silty clay<br>کلی لوم | 7.6-8.3 |
| *M. sativa* | 32°69’76" | 41°48’80" | 310.1 | 5-35.9°C | Semi-dry<br>نیمه‌خشک | Clay loam<br>کلی لوم | 7.4-8.2 |
| | | | | | Semi-dry | Clay loam | |

## نتایج

**نتایج حاصل از بررسی اکولوژیکی گونه‌های یونجه**

در این مطالعه گونه‌های گیاهی طی دو مرحله در فصل رویش و گلدهی گیاه یعنی اواخر فصل زمستان و اوایل بهار با مراجعه به منطقه مورد مطالعه و طی بازدید-های میدانی جمع‌آوری شد (جدول ۱).

بر اساس بررسی‌های انجام شده بر روی گونه‌های یونجه موجود در منطقه مورد مطالعه، مشخص گردید در محدوده‌ای که گونه *Medicago minima* وجود داشت نزولات آسمانی بیشتر به صورت باران و به‌ندرت برف بوده و میانگین بارندگی سالانه در حدود ۱۷۳/۳ میلیمتر می‌باشد. متوسط حداقل درجه حرارت در سردترین ماه سال که بهمن می‌باشد ۱ درجه سانتیگراد و میانگین حداکثر درجه حرارت در گرم‌ترین ماه سال ۳۵/۹ درجه سانتیگراد است. خاک منطقه با بافت کلی لوم و اسیدیته کمی قلیایی می‌باشد (جدول ۳). تیپ غالب این محدوده شامل *Poa bulbosa– Hordeum sp* است. گونه‌های همراه آن از تیره خشخاش- گندمیان، اسفناجیان- کمپوزیته و ... می‌باشد.

خاک منطقه حضور گونه *Medicago polymorpha* دارای بافت سیلتی لوم تا سیلتی کلی و سیلتی کلی لوم، ساختمان دانه‌ای با قابلیت نفوذپذیری متوسط و اسیدیته بین ۸ تا ۸/۳ میلی‌موس بر سانتی‌متر متغیر است. مرتع بزدره نیز جزو مراتع قشلاقی استان با بارندگی ۳۴۱ میلیمتر، اقلیم خشک تا نیمه‌خشک، سازند زمین‌شناسی لس و رسوبات بادی و رودخانه‌ای- یخچالی با بافت خاک متوسط سیلتی لوم تا کمی سنگین سیلتی کلی لوم است. این محدوده دارای تیپ‌های گیاهی مختلف شامل *Eruca sativa-Geranium lucidum-Medicago polymorpha* تیپ *Artemisia sieberi– Poa bulbosa* و تیپ گیاهی *Medicago polymorpha- Punica granatum* می‌باشد. در این محدوده گونه *Medicago polymorpha* به صورت تیپ و همراه با درختچه انار ظهور کرده است. از لحاظ خاک‌شناسی دارای خاک قهوه‌ای آهکی تا خاک سالین آلکالی، عمیق با بافت سیلتی، زهکشی متوسط، هدایت الکتریکی حدود ۳/۵ دسی-زیمنس بر متر و اسیدیته ۷/۹– ۷/۶ است که دارای شیب متوسط ۴۰–۲۰ درصد و به‌صورت تپه ماهور که متوسط ارتفاع مرتع حدود ۳۵۰ متر از سطح دریاست.

گونه *Medicago sativa*، *M. rigidula* و *M.scutellata* در محدوده ایستگاه چپرقویمه یافت شدند. گونه‌های *M. scutellata* و *M. sativa* به صورت دست‌کاشت در منطقه وجود دارند. اقلیم این منطقه بر اساس شاخص دومارتن نیمه‌خشک و بارش منطقه بیشتر به صورت باران و به ندرت به صورت برف است. میانگین بارندگی سالانه منطقه ۳۱۰/۱ میلیمتر می‌باشد. میزان میانگین دمای سالانه ۱۸/۵ درجه سانتی‌گراد است. میانگین حداکثر دما مربوط به مردادماه با ۳۵/۹ درجه و میانگین حداقل دما مربوط به اسفندماه با ۵ درجه سانتی-گراد می‌باشد. خاک عرصه عمدتاً عمیق تا نیمه‌عمیق با بافت متوسط تا کمی سنگین است. نفوذپذیری خاک در حد متوسط و میزان اسیدیته خاک بین ۷/۶ تا ۸/۳ میلی-موس بر سانتی‌متر متغیر است (جدول ۳). گونه‌های مختلف یونجه به صورت گونه همراه با گونه‌های گندمی و علفی یکساله مانند جو موشی و در تیپ جو پیازدار *Poa bulbosa* بود. در محدوده حضور گونه *M. truncatula* نیز خصوصیات اقلیمی نیمه‌خشک حاکم بوده و خاک دارای بافت سیلتی لوم تا سیلتی کلی بوده و دارای ساختمان دانه‌ای با قابلیت نفوذپذیری متوسط و اسیدیته بین ۸ تا ۸/۳ میلی‌موس بر سانتی‌متر متغیر است. از سویی گونه *M. rigidula* علاوه بر حضور در مراتع محدوده چپرقویمه، در محدوده‌ای با اقلیم خشک تا نیمه‌خشک، بافت خاک سیلتی، خاک با بافت متوسط سیلتی لوم تا کمی سنگین سیلتی کلی لوم و هدایت الکتریکی حدود ۱ تا ۳/۵ دسی‌زیمنس بر متر و اسیدیته ۷/۹– ۷/۵ وجود داشت (جدول ۳).

**نتایج حاصل از بررسی گرده‌شناسی گونه‌های یونجه**

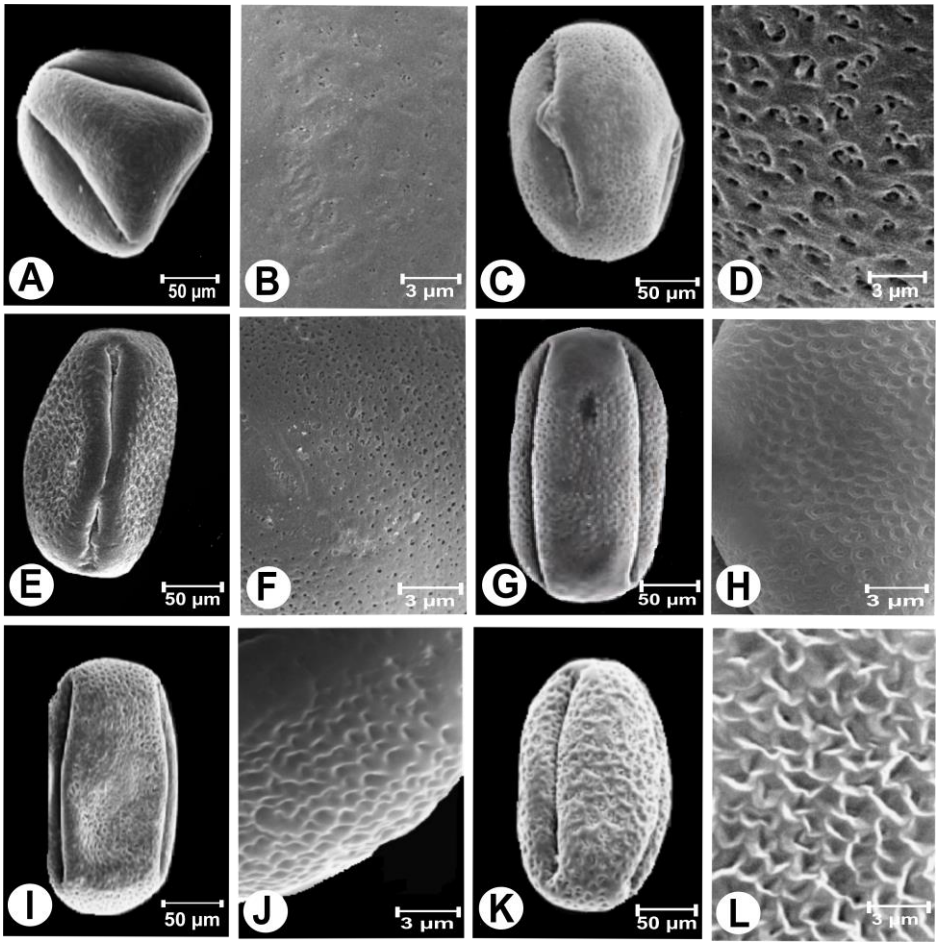
نتایج بررسی میکروسکوپی نمونه‌های گرده، اندازه‌گیری کلیه صفات مورد مطالعه و شرح و توصیف گونه‌ها در جدول ۴ آورده شده است. نتایج اندازه‌گیری دانه‌های گرده SEM نشان داد که کوچکترین دانه گرده در بین گونه‌های مورد بررسی مربوط به گونه *M. polymorpha* (۱۹/۱۵ میکرومتر) (شکل۴-C,D) و بزرگترین دانه گرده مربوط به گونه *M. sativa* (۳۱/۵۵ میکرومتر) (شکل۴-A,B) می‌باشد. طول محور قطبی از کوچکترین اندازه در گونه *M. polymorpha* (۱۹/۱۵ میکرومتر) تا بزرگترین اندازه در گونه *M. sativa* (۳۱/۵۵میکرومتر) متغیر است و طول محور استوایی از کوچکترین اندازه در گونه *M. polymorpha* (۱۹/۲۱ میکرومتر) تا بزرگترین اندازه در گونه *M. sativa* (۳۳/۶۵ میکرومتر) اندازه‌گیری شده است (جدول ۴). نسبت طول محور قطبی به طول محور استوایی (P/E) در اندازه‌گیری میکروگراف‌های به روش LM از ۰/۹۳ تا ۰/۹۹ متغیر است؛ بنابراین شکل دانه گرده طبق طبقه‌بندی ارتمن در این گونه elliptic (بیضوی) و Rectangular (مستطیلی) و Triangular (مثلثی) می‌باشد (شکل ۴).

**جدول ۴- صفات اندازه‌گیری شده دانه گرده (SEM) گونه‌های *Medicago* در استان گلستان**

**Table 4. Measured characteristics of pollen grains (SEM) of *Medicago* species in Golestan province**

| نام گونه | طول محور قطبی | طول محور استوایی | نسبت محور قطبی به استوایی | شکل | طول | عرض | تزئینات |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Taxon** | **P axis (µm ± SD)** | **E axis (µm ± SD)** | **P/E** | **Shape** | **Length** | **width** | **Ornamentation** |
| *M. rigidula* | 20.42 ± 0.38 | 21.57 ± 0.54 | 0.94 | مستطیلی | 28.28 ± 0.34 | 17.62 ± 0.31 | حفره‌دار |
| | 20.08 ± 0.31 | 21.20 ± 0.42 | 0.94 | Rectangular | 27.18 ± 0.14 | 17.20 ± 0.47 | Faveolate |
| *M. polymorpha* | 19.33 ± 0.68 | 19.55 ± 0.35 | 0.99 | بیضوی | 20.35 ± 0.26 | 14.42 ± 0.42 | حفره‌دار |
| | 19.15 ± 0.22 | 19.21 ± 0.13 | 0.99 | Elliptic | 21.16 ± 0.19 | 14.22 ± 0.32 | Faveolate |
| *M. minima* | 26.43 ± 0.32 | 27.45 ± 0.23 | 0.96 | مستطیلی | 27.42 ± 0.42 | 20.32 ± 0.31 | حفره‌دار |
| | 26.21 ± 0.12 | 27.23 ± 0.48 | 0.96 | Rectangular | 26.12 ± 0.19 | 20.25 ± 0.46 | Faveolate |
| *M. truncatula* | 28.25 ± 0.23 | 29.22 ± 0.16 | 0.96 | بیضوی | 27.42 ± 0.26 | 19.23 ± 0.27 | منفذدار |
| | 28.33 ± 0.23 | 29.35 ± 0.26 | 0.96 | Elliptic | 27.22 ± 0.34 | 19.47 ± 0.24 | Perforate |
| *M. scutellata* | 27.35 ± 0.48 | 28.15 ± 0.29 | 0.97 | بیضوی | 28.25 ± 0.49 | 18.38 ± 0.68 | حفره‌دار |
| | 27.15 ± 0.26 | 28.31 ± 0.16 | 0.95 | Elliptic | 28.21 ± 0.29 | 18.51 ± 0.57 | Faveolate |
| *M. sativa* | 31.55 ± 0.40 | 33.65 ± 0.34 | 0.93 | مثلثی | 33.40 ± 0.22 | 22.69 ± 0.34 | منفذدار |
| | 31.23 ± 0.36 | 33.44 ± 0.38 | 0.93 | Triangular | 33.67 ± 0.31 | 23.62 ± 0.57 | Perforate |

P=Length of polar
E=Length of equatorial




شکل ۴- بررسی صفات ریز ریخت‌شناسی سطح گرده‌ها با میکروسکوپ الکترونی (**SEM**)

**Figure 4. Examining the micromorphological characteristics of pollen surface with electron microscope (SEM) A و B :*M. sativa*، C و D :*M. polymorpha* ، E و F :*M. truncatula*، G و H :*M. scutellata* I و J:.*minima. M*،K و L :*M. rigidula***

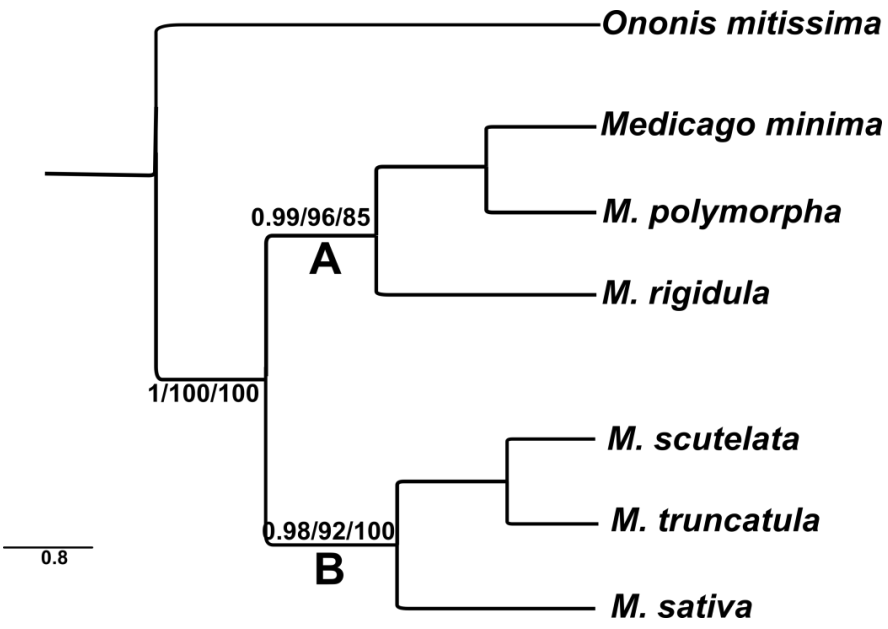
نتایج به دست آمده در مورد مطالعه دانه گرده گونه‌های مختلف جنس *Medicago* در استان گلستان بیانگر آن بود که دانه‌های گرده از نوع سه شیار روزن‌دار (Trizoncolporate) با شیارهای دمبلی شکل و دارای اپرکیول (Opercule) در محل روزن هستند. در این مطالعه گونه‌های مورد مطالعه دارای گرده با مشخصات ذکر شده یعنی از دید استوایی بیضوی تا مستطیلی (Rectangular) و از دید قطبی شکل دانه‌های گرده این گونه سه گوشه و مثلثی با نوک کند (Obtus- Triangular) و در برخی گونه‌ها بصورت چهار وجهی (Quadrangular) بودند. از نظر شکل و از منظر استوایی، دانه گرده برخی گونه‌های یونجه بیضوی (Elliptic) و از منظر قطبی سه گوش کند (Obtus- Triangular) است. نتایج بررسی صفات ریخت‌شناسی سطح دانه گرده با میکروسکوپ الکترونی در این تحقیق نشان داد که تزئینات سطح اگزین در دانه‌های گرده بررسی شده از نوع حفره‌دار (Foveolate) و منفذدار (Perforate) بود. با بررسی تزئینات سطح اگزین می‌توان گونه‌های یونجه را به دو تیپ اصلی مشبک و زگیل‌دار تقسیم کرد. عمده گونه‌های یونجه متعلق به تیپ مشبک هستند. این نوع تزئینات به شکل‌های مختلف ازجمله منفذدار، حفره‌دار، مشبک نامنظم و اسکوربیولات ظاهر می‌شود که بر این اساس به گروه‌های فرعی‌تر تقسیم می‌شوند.

**نتایج حاصل از بررسی مولکولی گونه‌های یونجه**

**آنالیز داده‌های nrDNA ITS**

توالی‌های هم‌ردیف‌سازی شده nrDNA ITS مربوط به ۷ تاکسون، ماتریسی به طول ۶۸۲ جایگاه نوکلئوتیدی ایجاد کرد که از این میان ۱۱۴ جایگاه از لحاظ پارسیمونی اطلاع‌ساز و بقیه غیراطلاعاتی بودند. در این آنالیز گونه *Ononis mitissima* براساس مطالعات قبلی (Ellison *et al*., 2006) به عنوان برون‌گروه انتخاب شد. نتایج آنالیز تک‌نیایی بودن گونه‌های *Medicago* را در این فیلوگرام با حمایت بالا (PP= 1, ML BS=100, MP BS=100) نشان می‌دهد.

بعد از برون‌گروه به ترتیب دو کلاد اصلی A و B در درخت هسته‌ای مشخص شد (شکل ۵). کلاد اول (A) شامل ۳ گونه *Medicago minima*، *M. polymorpha* و *M. rigidula* که گونه‌هایی یکساله و خاردار هستند با حمایت بالا در کنار هم قرار می‌گیرند (PP=0/99, ML BS=96, MP BS=85). همچنین کلاد دوم (B) شامل گونه‌های *M. scutellata* و *M. sativa* گونه‌هایی فاقد خار هستند و گروه مجزایی را تشکیل می‌دهند (PP=0/98, ML BS=92, MP BS=100). گونه خاردار *M. trucatula* در میان گونه‌های بدون خار قرار گرفته است، این موضوع مؤید تکامل موازی این صفت در میان گیاهان یونجه می‌باشد.




شکل ۵- درخت تبارزایی حاصل از آنالیز توالی **nrDNA ITS** با استفاده از روش بیزین

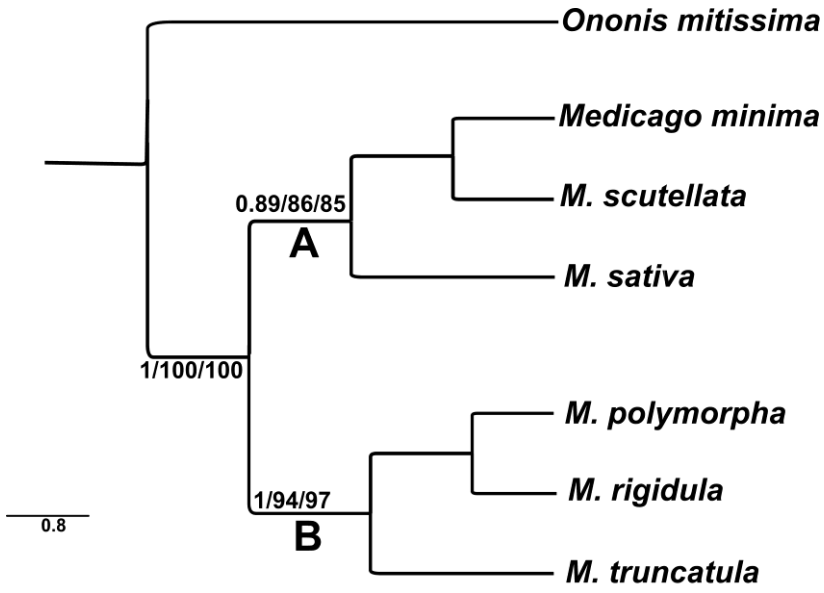
اعداد روی شاخه‌ها، ارزش حدود اطمینان آنها را نشان می‌دهند (به ترتیب **PP Bayesian, BS Likelihood, BS Parsimony**). مقدار حمایت بالای ۵۰ نشان داده شده است.

**Figure 5- Phylogenetic tree resulting from Bayesian phylogenetic analysis of the nrDNA ITS dataset. The Numbers above the branches are posterior probability and likelihood as well as parsimony bootstrap values, respectively. Values > 50% are shown.**

### آنالیز داده‌های rpl32-trnL(UAG)

توالی‌های هم‌ردیف‌سازی شده *rpl*32-*trn*L(UAG) مربوط به ۷ تاکسون، ماتریسی به طول ۱۱۷۸ جایگاه نوکلئوتیدی ایجاد کرد که از این میان ۲۸۵ جایگاه از لحاظ پارسیمونی اطلاع‌ساز و بقیه غیراطلاعاتی بودند. نتایج آنالیز کلروپلاستی مانند آنالیز هسته‌ای، تک‌نیایی بودن گونه‌های *Medicago* را در این فیلوگرام با حمایت بالا ( PP= 1, ML BS=100, MP BS=100) نشان می‌دهد (شکل ۶).

بعد از برون‌گروه همانند درخت هسته‌ای به ترتیب دو کلاد اصلی A و B در درخت کلروپلاستی مشخص شد. کلاد اول (A) شامل ۳ گونه *M. sativa*، *M. scutellata* و *M.minima* با حمایت بالا در کنار هم قرار می‌گیرند (PP=0/89, ML BS=86, MP BS=85). همچنین کلاد دوم (B) شامل گونه‌های *M. polymorpha*، *M. rigidula* و *M. truncatula* یک گروه با حمایت بالا تشکیل می‌دهند (PP=1, ML BS=94, MP BS=97). درخت کلروپلاستی و هسته‌ای شباهت زیادی با یکدیگر داشته فقط در موقعیت برخی گونه‌ها شامل *M. minima* و *M. truncatula* ناسازگاری نشان می‌دهند.




شکل ۶- درخت تبارزایی حاصل از آنالیز توالی ***rpl*32-*trn*L(UAG)** با استفاده از روش بیزین

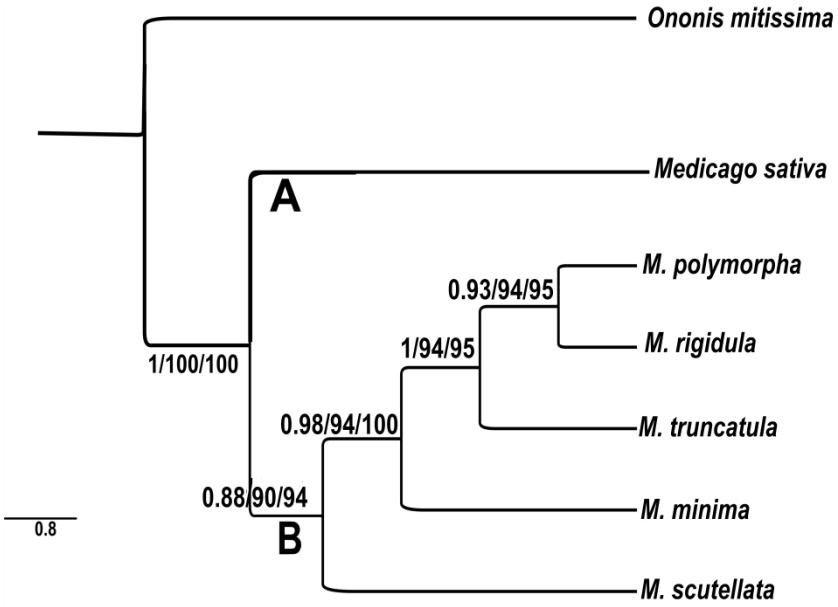
اعداد روی شاخه‌ها، ارزش حدود اطمینان آنها را نشان می‌دهند (به ترتیب **PP Bayesian, BS Likelihood, BS Parsimony**). مقدار حمایت بالای ۵۰ نشان داده شده است.

**Figure 6. Phylogenetic tree resulting from Bayesian phylogenetic analysis of the *rpl*32-*trn*L(UAG) dataset. Numbers above the branches are posterior probability and likelihood as well as parsimony bootstrap values, respectively. Values > 50% are shown.**

### آنالیز داده‌های ترکیبی nrDNA ITS, cpDNA *rpl*32–*trn*LUAG

آنالیزهای حاصل از داده‌های ترکیبی، روابط حمایت‌شده‌تری نسبت به آنالیزهای حاصل از قطعات به صورت جداگانه نشان می‌دهند. حمایت‌های مطرح شده به ترتیب احتمال پسین، بوتسترپ حاصل از آنالیز بیشینه درست‌نمایی و بوتسترپ حاصل از روش بیشینه صرفه‌جویی هستند (شکل ۷). توالی‌های نوکلئوتیدی هم‌ردیف‌سازی شده آنالیز

ترکیبی مربوط به ۷ آرایه به طول ۱۸۶۰ جایگاه نوکلئوتیدی ایجاد کرد که از این میان ۲۲۰ جایگاه از لحاظ پارسیمونی اطلاعاتی بوده و بقیه جایگاه‌ها غیراطلاعاتی بودند. درختان حاصل از آنالیز داده‌های ترکیبی با روش‌های بیشینه صرفه‌جویی، بیشینه درست‌نمایی و بیزین الگوی یکسانی نشان می‌دهند. درخت بیزین به دلیل حل شدن بهتر روابط گونه‌ها و حمایت‌های بالاتر نشان داده شده است. نتایج حاصل از درخت ترکیبی، دو کلاد مجزا را نشان داد که در کلاد A با حمایت بالا گونه چندساله *M. sativa* و در کلاد B گونه‌های یکساله شامل بقیه گونه‌های مورد مطالعه با حمایت بالا (PP=0.88, ML BS=90, MP BS=94) قرار گرفتند.




شکل ۷- درخت تبارزایی حاصل از آنالیز توالی‌های ترکیبی با استفاده از روش بیزین

اعداد روی شاخه‌ها، ارزش حدود اطمینان آنها را نشان می‌دهند (به ترتیب **PP Bayesian, BS Likelihood, BS Parsimony**). مقدار حمایت‌های بالای ۵۰ نشان داده شده است.

**Figure 7. Phylogenetic tree resulting from Bayesian phylogenetic analysis of the concatenated nrDNA ITS and *rpl*32-*trn*L$_{(UAG)}$ dataset. Numbers above the branches are posterior probability and likelihood as well as parsimony bootstrap values, respectively. Values > 50% are shown.**

## بحث

بر اساس بررسی‌های به عمل آمده در این مطالعه، مشخص گردید که گونه‌های مختلف جنس یونجه با اقلیم منطقه مورد مطالعه به خوبی سازگاری شده‌اند. یونجه‌های یکساله گیاهانی مناسب برای کشت در مناطقی هستند که دچار مشکل فرسایش خاک می‌باشند و از آنجا که این مناطق با محدودیت منابع آبی مواجه هستند، یونجه‌های یکساله در برابر تنش خشکی مقاوم می‌باشند، این عامل موجب می‌شود گیاهان مزبور در مناطق با بارندگی کم نیز رویش مناسبی داشته باشند. به عبارتی مقاوم بودن این گونه‌ها در برابر تنش خشکی، نقش مهمی در استقرار آنها ایفا می‌کند (Hanteh & Zare Chahoki , 2012). نتایج

اکولوژیکی این پژوهش نیز با نتایج حاصل از مطالعات ذکر شده از نظر پراکنش این سرده در اقلیم خشک و نیمه‌خشک منطقه مورد مطالعه همخوانی دارد. با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق مشخص گردید که گونه‌های مختلف جنس یونجه در خاک‌هایی با بافت متوسط تا سنگین و بیشتر لسی، سیلتی لوم، سیلتی کلی و سیلتی کلی لوم با اسیدیته قلیایی (۷/۵ تا ۸/۶ میلی‌موس بر سانتی‌متر) به خوبی استقرار یافته‌اند. این نتیجه با مطالعه Hanson و Barnes (۱۹۸۸) که بیان نمودند بسیاری از یونجه‌های یکساله جزو آن دسته از گیاهانی هستند که در خاک‌های خنثی تا قلیایی و مناطق دارای بارندگی سالانه ۲۵۰ تا ۶۰۰ میلی‌متر و ارتفاع کمتر از ۱۰۰۰ متر از سطح دریا مشاهده شده و از رشد و نمو خوبی برخوردارند، مطابقت دارد.

بررسی‌ها بر روی گونه *M. minima* نشان داد که این گونه در منطقه‌ای با میانگین بارندگی سالانه در حدود ۱۷۳/۳ میلیمتر، میانگین حداقل و حداکثر درجه حرارت به ترتیب ۱ و ۳۵/۹ درجه سانتیگراد و خاک با بافت کلی لوم و اسیدیته کمی قلیایی حضور داشت. بررسی اکولوژیک منطقه حضور گونه *M. polymorpha* نشان داد که در این منطقه میانگین بارندگی ۳۴۱ میلیمتر در سال، خاک با بافت سیلتی، سیلتی لوم تا سیلتی کلی و سیلتی کلی لوم، ساختمان متوسط دانه‌ای با قابلیت نفوذپذیری متوسط، اسیدیته بین ۷/۶ تا ۸/۳ میلی‌موس بر سانتی‌متر و هدایت الکتریکی تا ۳/۵ دسی‌زیمنس بر متر و ارتفاع حدود ۳۵۰ متر بود. بر اساس مطالعات Hanteh و Zare Chahoki (۲۰۱۲) گونه *M. polymorpha* از گسترده‌ترین یونجه‌های یکساله کشور است که در تمام مناطق رویشی، در اراضی جلگه‌ای، کوهستانی و مرتفع در بارندگی سالانه ۳۵۰ تا ۶۰۰ میلی‌متر مشاهده می‌شود. این گیاه خاک‌های رسی، لوم رسی و لومی را ترجیح می‌دهد و در اسیدیته خنثی تا کمی قلیایی بهترین رشد را دارد که موارد ذکرشده با نتایج این پژوهش مطابقت دارد. گونه *M. scutellata* یا یونجه حلزونی از گونه‌های دست‌کاشت منطقه است که قابلیت محصول‌دهی بالا در دامنه وسیعی از نظر خاک و شرایط اقلیمی را داراست (Sharafi, 2020).این گیاه از گونه‌های وارداتی است که در بارندگی سالانه ۳۰۰ تا ۵۵۰ میلی‌متر مستقر می‌شود و حساسیت زیادی به سرما دارد (*et al.*, 2007 ؛ Zare Chahoki & Hanteh, 2012). بر پایه نتایج، اقلیم این منطقه نیمه‌خشک با میانگین بارندگی سالانه منطقه ۳۱۰/۱ میلیمتر، میانگین دمای سالانه ۱۸/۵ درجه سانتی‌گراد (میانگین حداکثر دما ۳۵/۹ درجه و میانگین حداقل دما ۵ درجه سانتی‌گراد) می‌باشد. خاک عرصه عمدتاً عمیق تا نیمه‌عمیق با بافت متوسط تا کمی سنگین و میزان اسیدیته خاک بین ۷/۶ تا ۸/۳ میلی‌موس بر سانتی‌متر متغیر است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که نتایج این پژوهش با مطالعات Hanteh و Zare Chahoki (۲۰۱۲) و Sharafi (۲۰۲۰) همخوانی دارد. اقلیم نیمه‌خشک، خاک دارای بافت سیلتی لوم تا سیلتی کلی دارای ساختمان دانه‌ای با قابلیت نفوذپذیری متوسط و اسیدیته بین ۸ تا ۸/۳ میلی‌موس بر سانتی‌متر نیز از خصوصیات محدوده حضور گونه *M. truncatula* بود. این گونه گیاهی مقاوم به چرا و دارای شکل افراشته است که بیشتر در دشت‌ها، کشتزارها، کنار جاده‌ها و در دامنه‌های سنگی با بارندگی سالانه ۲۵۰ تا ۵۰۰ میلی‌متر می‌روید (Hanteh 2012; Zare Chahoki *et al.*, 2007,& ). یونجه معمولی یا *Medicago sativa* توانایی سازش‌پذیری زیادی با شرایط آب و هوایی و خاک دارد. این گیاه با آب و هوای مناطق خشک و نیمه‌خشک سازگار است. یونجه در خاک‌های عمیق لومی با زهکشی مناسب به خوبی رشد می‌کند و در مقایسه با دیگر بقولات، به اسیدیته خاک حساس است. در اسیدیته ۶/۵– ۷/۵ عملکرد آن در شرایط بهینه است (Hanteh & Zare Chahoki, 2012). نتایج مطالعات ما در این پژوهش نیز حکایت از اقلیم خشک و نیمه‌خشک و خاک با اسیدیته قلیایی در منطقه استقرار این گونه دارد که با مطالعه Hanteh و Zare Chahoki (۲۰۱۲) منطبق

است. همچنین گونه *M. rigidula* در محدوده‌ای با اقلیم خشک تا نیمه‌خشک، خاک سیلتی، با بافت متوسط سیلتی لوم تا کمی سنگین سیلتی کلی لوم و هدایت الکتریکی حدود ۱ تا ۳/۵ دسی‌زیمنس بر متر و اسیدیته ۷/۹- ۷/۵ حضور دارد.

نتایج به دست آمده در مورد مطالعه دانه گرده گونه‌های مختلف جنس *Medicago* در استان گلستان بیانگر آن بود که دانه‌های گرده از نوع سه شیار روزن دار (Trizoncolporate) با شیارهای دمبلی شکل و دارای اپرکیول (Opercule) در محل روزن هستند. این نتیجه با مطالعه Moore و همکاران (۱۹۹۱) و Ghanavati و همکاران (۲۰۰۷) در بررسی ریخت‌شناسی دانه گرده گونه‌های *Medicago* در ایران هم‌خوانی دارد. نتایج مطالعه Ghanavati (۲۰۱۰) و Amirabadi Zadeh (۲۰۰۹) در رابطه با ریخت‌شناسی دانه گرده گونه‌های اسپرس و Salimpour و همکاران (۲۰۱۶) در مورد گونه‌های جنس *Trifolium* نشان‌دهنده این بود که دانه گرده این گونه‌ها نیز از نوع سه شیاری است. با توجه به مطالب ذکرشده به نظر می‌رسد شباهت ظاهری دانه‌های گرده باعث تعلق هر سه گونه یونجه، اسپرس و شبدر به تیره باقلائیان باشد. Moore و همکاران (۱۹۹۱) بیان کردند که از نظر شکل و از منظر استوایی، دانه گرده گونه‌های یونجه بیضوی (Elliptic) و از منظر قطبی سه گوش کند (Obtus-Triangular) است. Ghanavati و همکاران (۲۰۰۷) نیز در بررسی دانه گرده گونه‌های مختلف یونجه، این نتایج را تأیید کردند. Salimpour و همکاران (۲۰۱۶) در مورد گونه‌های جنس *Trifolium* نیز به چنین نتایجی دست یافتند. نتایج بررسی صفات ریخت‌شناسی سطح دانه گرده با میکروسکوپ الکترونی در این تحقیق نشان داد که تزئینات سطح اگزین در دانه‌های گرده بررسی‌شده از نوع حفره‌دار (Faveolate) و سوراخ‌دار (Perforate) بود که با تحقیقات Ghanavati و همکاران (۲۰۰۷) مطابقت دارد. این نوع تزئینات به شکل‌های مختلف ازجمله سوراخ‌دار، حفره‌دار، مشبک نامنظم و اسکوربیولات ظاهر می‌شود که بر این اساس به گروه‌های فرعی‌تر تقسیم می‌شوند (Ghanavati *et al.*, 2007)

به گونه‌های *Medicago* در مطالعات تبارزایشی قبلی که در ایران انجام شده توجه بسیار کمی شده و تحقیقات ما اولین پژوهش تبارزایشی مولکولی روی این گونه‌هاست. همه گونه‌های مورد بررسی یونجه یک گروه تک‌نیا با حمایت بالا (PP =1.00, ML BS =100, MP BS=100) را تشکیل می‌دهند. در این مطالعه که روی ۶ گونه انجام شده مطالعات هسته‌ای، کلروپلاستی و ترکیبی حاصل از آنالیز توالی نشان می‌دهد که همه گونه‌های مورد بررسی یک گروه تک‌نیا با حمایت بالا (PP =1.00, ML BS =100, MP BS=100) را تشکیل می‌دهند. در درخت مولکولی دو گروه اصلی تشخیص داده شدند. گونه چندساله *M. sativa* در کلادی مجزا در مجاورت گونه‌های یکساله قرار گرفته است که نشان‌دهنده تک‌نیا بودن گونه‌های یکساله است. گونه چندساله *M. sativa* در کنار گونه‌های یکساله و در کلادی مجزا جای گرفت، این نتیجه تک‌نیا بودن گونه‌های یکساله را نشان می‌دهد و مؤید این مطلب است که در طول تکامل ابتدا چندساله‌ها به وجود آمده و بعد یکساله‌ها مشتق شدند و اینکه چندساله بودن یک صفت نیایی محسوب می‌شود. Lesinsو Lesins (۲۰۱۲) بر اساس صفات دوره رویشی و سیستم لقاحی بیان کرده‌اند که گونه‌های نیایی جنس *Medicago*عمدتاً گونه‌های چندساله و دگرلقاح هستند. آنان معتقدند که گونه‌های یکساله و خودلقاح در مسیر تکامل از گونه‌های چندساله مشتق شده‌اند و نظریه تک‌نیا بودن جنس را مطرح نمودند که این نتایج با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. در مطالعه‌ای که Ghanavati (۲۰۱۰) روی گونه‌های یونجه انجام داد مشخص شد که گونه‌های یکساله به صورت موازی تکامل یافته‌اند و در طول تکامل ابتدا یکساله‌ها به وجود آمده و بعد چندساله‌ها و دوباره یکساله‌ها مشتق شدند و چندساله بودن الزاماً یک صفت نیایی محسوب نمی‌شود و این نتایج

در تناقض با یافته‌های این مطالعه است.

## نتیجه‌گیری

این مطالعه ثابت کرد که خصوصیات بوم‌شناختی، ریزریخت‌شناسی و داده‌های مولکولی در تمایز با گونه‌های یونجه مفید است. ایران به علت داشتن شرایط اقلیمی متنوع یکی از بزرگترین مراکز پیدایش و تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای جنس یونجه محسوب می‌شود و شناسایی این گونه‌ها امکان انتخاب ژنهای مناسب و سازش‌یافته با هر محیط و انتقال آنها به گونه زراعی به منظور تولید ارقام متحمل به تنش را برای به‌نژادگران و متخصصان بیوتکنولوژی فراهم می‌کند. بررسی روابط خویشاوندی بین گونه‌ها و تکامل صفات، می‌تواند به عنوان ابزاری در تعیین احتمال موفقیت در انجام تلاقی‌های بین گونه‌ای استفاده شود. از آنجایی که یونجه‌های یکساله به‌طور بالقوه منابع ژنتیکی مطمئنی برای اصلاح یونجه چندساله هستند، در طول چند سال گذشته به شدت مورد توجه به‌نژادگران قرار گرفته‌اند. بنابراین اطلاعات بدست آمده برای اطمینان از ثبات و پایداری نتایج حاصل از دورگه‌های بین گونه‌های دیپلوئید و تتراپلوئید مفید به نظر می‌رسد.

## منابع مورد استفاده:


– Amirabadi Zadeh, H., Jafari, A. Mahmmodzadeh Akherat, H. and Ghanavati, F., 2009. Morphological study of pollen grains of perennial species of spruce genus (Onobrychis) in Khorasan province. Journal of Agricultural Sciences of Iran. 11(1):1-14. (In Persian).

– Bayat, M., Assadi, M., Small, E. and Mehregan, I., 2021a. Molecular studies of Iranian populations support the morphology-based taxonomic separation of *Medicago rigidula* and *M. rigiduloides*. Phytotaxa, 518(4): 281-299.

– Bayat, M., Assadi, M., Small, E. and Mehregan, I., 2021b. Territorial partitioning of the contact zone of the european *Medicago rigidula* and the closely related Asian *Medicago rigiduloides* in Iran. Iranian Journal of Botany, 27 (2).

– Bounejmate, M., Robson, A. D., and Beale, P. E., 1992. Annual Medicago species in Morocco. II. Distribution in relation to soil and climate. Australian Journal of Agricultural Research, 43(3): 751-763.

– 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).

– Ellison, N. W., Liston A, Jeffrey J. S., Warren M. W. , and Taylor, N. L., 2006. Molecular phylogenetic of the clover genus (*Trifolium—Leguminosae*). Molecular Phylogenetic and Evolution 39:688–705.

– Erdtman, G. 1952. Pollen Morphology and Plant Taxonomy. Angiosperms. Chronica Botanica Co., Waltham, Massachusetts. Copenhagen.

– Falahati Anbaran, M., Habashi, A. A., Esfehani, M., Mohammadi, S. A. and Gharehyazi, B., 2005. Structure and genetic diversity among and whitin 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).

– Farsi, M. and Zolali, J., 2004. Principle of Plant biotechnology. Ferdosi Mashhad University Press, 495 pp.

– Ghanavati, F., Mozaffari, J., Massoumi, A. A. and Kazempour Sh., 2007. Morphological studies of pollen grains of *Medicago* species in Iran. Iranian Journal of Crop Sciences, 9(2): 184-199. (In Persian)

– Ghanavati, F., 2010. Phylogenetic relationships of *Medicago* species in Iran. Iranian Journal of Crop Sciences, 13(2): 424-435. (In Persian)

– Halbritter, H., Ulrich, S., Grímsson, F., Weber, M., Zetter, R., Hesse, M., Buchner, R., Svojtka, M. and Frosch-Radivo, A., 2018. Illustrated pollen terminology. Springer.

– Hanson, C. H. and Barnes, D. K., 1988. Alfalfa. 136-137 pp. In: Heath, M. E., Metcalfe, D. S., and Barnes, R. F. (eds.). Forages, the science of grassland agriculture. The Iowa State University Press. Ames. Iowa.

– Hanteh, A. and Zare Chahouki, M. A., 2012. Introduction of forage plants and their cultivation method. Institute of Applied Scientific Higher Education of Jihad Agriculture, 180 p.

Jihad Agriculture. 160 p.
– Radwan, M. S., Al Fakhry, A. K. and Al Hassan, A. M., 1978. Some observations on the performance of annual medics in Northern Iraq [pastures feed crops]. Mesopotamia Journal of Agriculture, 13: 55-67.
– Rechinger, K. H. 1984: *Medicago* L. In Rechinger, K. H. (ed.), Fl. Iranica vol. 157: 253-274. – Akademische Druck und Verlagsanstalt, Graz.
– Ronfort, J., Jenczwski, E., Bataillon, T. and Rosset, F., 1998. Analysis of population structure in autotetraploid species. Genetics, 150: 921-930.
– Ronquist F. and Huelsenbeck J., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics, 19: 754–755.
– Salehi, p. Salehi Shanjani, P., Ashraf Jafari, A. and Bakhshi Khaniki, Gh., 2010. Genetic Diversity of Iranian Wild *Medicago sativa* Populations Based on Total Proteins and its Association with Ecological Factors. Seed and Plant Journal, 28(1): 463-480.
– Salimpour, F., Mostafavi, G., Haj Rasooliha Sh. and Sharif Nia F., 2016. Phenetic investigation of *Trifolium* species using pollen grain traits. Development Biology, 8(3): 41-52.
– Swofford, D. L., 2002. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), ver. 4.0b10. – Sinauer Associates, Sunderland.
– Silvestro, D. and Michalak, I., 2012. Raxml GUI: a graphical front-end for RAxML. Organisms Diversity and Evolution, 12: 335-337.
– 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.
– Sharafi, S., 2020. Effective methods for improving seed germination of *Medicago scutellata* affected by salinity and drought. Iranian Journal of Seed Research, 6(1): 12-30. (In Persian)
– Shariat, A., Mirzaei Nadooshan, H., Ghamari Zare, A. and Sangtarash, M. H., 2001. Electrophoresis studying of storing proteins in yearlong *Medicago sativa*. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 9: 67-80 (in Persian).
– Small, E., Bassett, I. J. and Crompton, C. W., 1981. Pollen variation in tribe Trigonelleae (Leguminosae) with special reference to *Medicago*. Pollen et Spores, 23: 295-320.
– 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.
– 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).
– 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(2): 1-5 (in Persian).
– Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., Higgins, D. G., 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics. 23(21):2947-8.
– Lesins, K. A. and Lesins, I., 2012. Genus Medicago (Leguminosae): a taxogenetic study. Springer Science & Business Media.
– Mehregan, I., Rahiminejad, M. R., Azizian, D., 2002. A taxonomic revision of the genus *Medicago* L. (Fabaceae) in Iran. Iranian Journal of Botany, 9(2): 207-221.
– Moneim, A. A. M. and Cocks, P. S., 1986. Adaptation of *Medicago rigidula* to a cereal-pasture rotation in north-west Syria. Journal of Agricultural Science (Cambridge), 107: 179-180.
– Moore, P. D., Webb, J. A. and Collinson, M. E., 1991. Pollen analysis Oxford, Malden, MA: Blackwell Science, 256pp.
– Noeparvar, S., Valizadeh, M., Monirifar, H., Haghighi, 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.
– Posada, D. and Buckley, T. R., 2004. Model selection and model averaging in phylogenetics: Advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. Systematic Biology, 53: 793–808.
– 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. Publications of Institute of Applied Scientific Higher Education of

(*Medicago* sp.) frpm trans-Himalaya using RAPD and ISSR markers. African Journal of Biotechnology, 10: 8176-8187.
– Zare Chahoki, M. A., Jafari, M. and Azarnivand H., 2007. Relationships between species diversity and environmental factors of Poshtkouh rangelands in Yazd, Pajouhesh & Sazandegi, 21(1): 192-199. (In Persian)
– White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. – In: Innis D. H., Gelfand J. J., Sninsky et al. (eds.): PCR protocols: a guide to methods and applications, p. 315–322. – Academic Press, San Diego.
– Xavier, J. R., Kumar, J. and Srivastava, R. B., 2011. Characterization of genetic structure of alfalfa

# Ecological, micro-morphological and molecular studies on *(Medicago L.)* species in rangeland ecosystems of Golestan province, Iran

**G. Gerailou[1], A. Tahmasebi[2*], E. Amini[3], B. Behmanesh[4]**

1- MSc graduated, Dept. Range and Watershed Management, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University, Gonbad, I.R. Iran, Iran

2*- Corresponding author, Assist. Prof., Dept. Range and Watershed Management, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University, Gonbad, I.R. Iran, Iran, Email: ab_tahmasebi@gonbad.ac.ir

3- Assist. Prof., Dept. Biology, Faculty of Science, Gonbad Kavous University, Gonbad, I.R. Iran, Iran

4- Assist. Prof., Dept. Range and Watershed Management, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University, Gonbad, I.R. Iran, Iran.

Received: 07.07.2022 Accepted: 30.11.2022

**Abstract**

In order to identify the ecological, micro-morphological and molecular characteristics of six alfalfa species (*Medicago* L.), this research was conducted by collecting data of habitat information, vegetation characteristics and the soil characteristic in sampling depth (0 to 30 cm) of the species in their habitat. The pollen grain morphology of the species was investigated using scanning electron microscopy (SEM). Investigation of the molecular relationships between six species was done using nuclear nrDNA ITS and rpl32-trnL$_{(UAG)}$ chloroplast sequences. The results of the ecological study showed that the most species in the study area grew in arid to semi-arid climate and in silty, silty-clay and silty-clay-loam soils. Based on the results, most of the pollen grains were medium-sized and trizoncolporate and rarely had four to six colpus. In addition, molecular studies showed that all the tested species formed a monophyletic group with high support. The perennial *Medicago* species was located in a separate clade in the vicinity of the annual species, which indicates that the annual species are monophyletic. The results of this study indicate the efficiency of molecular markers in determining the relationship of taxa at the species level, and it can be used as a complementary tool in the taxonomic identification of *Medicago* species.

**Keywords**: Pollen grain, ecology, *Medicago*, nuclear marker, plastid marker.