Iranian Journal of Field Crop Science
Vol 49, No 2, Sumer 2018 (131-149)
DOI: 10.22059/ijfcs.2017.228048.654280

علوم گیاهان زراعی ایران
دورهٔ ۴۹، شمارهٔ ۲، تابستان ۱۳۹۷ (ص۱۴۹-۱۳۱)

بررسی ویژگی‌های کاریوتیپ ده جمعیت محوری یونجه (*Medicago sativa* L.) در ترکیه

عیسی ظریفی[1*]، جعفر سری سویم آی[2] و صباحتدین آل بایراک[3]

۱. سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال وبذر، تحقیقات ژنتیک و بانک ژن گیاهی ملی ایران، کرج، ایران ۲. دانشگاه آنکارا، گروه اصلاح نباتات، آنکارا، ترکیه و دانشجوی سابق دکتری، دانشگاه آنکارا، گروه اصلاح نباتات، آنکارا، ترکیه ۳. دانشگاه سلیمان دمیرل ، گروه اصلاح نباتات، ایسپارتا، ترکیه

(تاریخ دریافت: ۹۵/۱۲/۰۱ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۵/۲۵)

چکیده

بررسی‌های یاخته‌شناختی (سیتوژنتیکی) روی ده جمعیت محوری یونجهٔ انتخاب‌شده از منابع ذخایر توارثی (ژرم پلاسم) مناطق دریاچه‌ای استان‌های ترکیه برای تولید رقم (واریته)های مصنوعی یا ساختگی (سنتتیک) انجام شد. مریستم‌های نوک ریشه‌ای به‌دست‌آمده از گیاهان همسان و همسن ازدیاد یافته از روش غیرجنسی رویشی از یک والد در گلدان‌های گلخانه، در محلول دوهزارم مولار ۸- هیدروکسی کینولین پیش تیمار و سپس در رنگ استوایرون هماتوکسیلن رنگ‌آمیزی شدند. تجزیهٔ کاریوتیپ جمعیت‌ها نشان داد، همهٔ جمعیت‌ها تتراپلوئید و ۲n=٤x=۳۲ کروموزوم دارند. اندازهٔ کروموزوم‌ها خیلی کوچک در محدودهٔ 1.69-5.92 میکرون هستند. کروموزوم‌های B و هترومورف مشاهده شده است. بدین سبب ناهمگون (هتروژن) بودن جمعیت‌های یونجهٔ این مناطق محرز شده است. در فرمول کاریوتیپ جمعیت‌ها که کروموزوم‌های آن‌ها در ۸ تتراد کلاس‌بندی شده‌اند دو جور کروموزوم (m میان مرکز یا متاسانتریک و sm ساب متاسانتریک) دیده شده است. تقارن و نبود تقارن کاریوتیپ جمعیت‌ها با استفاده از شاخص‌های مختلف؛ استبینس، A1 (درون کروموزومی) و A2 (میان کروموزومی) روش رومرو و زارکو ارزیابی شد. بر پایهٔ تفاوت درون کروموزومی و بین کروموزومی جمعیت‌ها گروه‌بندی شدند.

واژه‌های کلیدی: تقارن کاریوتیپ، سیتوژنتیک، کروموزوم B، مصنوعی، هترومورف، یونجه (*Medicago sativa* L.) .

Karyotype characterization of ten pivotal populations of *Medicago sativa* L. in Turkey

Eissa Zarifi[1], Jafar Sırrı Sevimay[2], Sebahattin Albayrak[3]

1. Genetics and Genetic Resources Research Department, Seed and Plant Improvement Institute(SPII), Agricultural Research & Education Organization(AREO), Karaj, Iran
2. Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ankara University, Ankara, Turkey
3. Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Suleyman Demirel University, Isparta, Turkey

(Received: February 19, 2017 - Accepted: August 16, 2017)

ABSTRACT

Cytogenetically studies were carried out on ten selected populations of alfalfa (*Medicago sativa* L.) of Lake Regions in Turkey. Root tips meristems obtained from plants of similar age that originated by vegetative reproduction from a single parent from plants grown under greenhouse conditions, were pretreated with saturated solution of 0.002 M 8-Hydroxiquinolin before staining with aceto-iron-hematoxylin. Karyotype analysis showed that all populations were tetraploid (2n=4x= 32). The chromosomes are small, ranging from 1.69-5.92 microns in length. B chromosome and heteromorphic chromosomes were established. Due to these phenomenons, the existences of heterogeneous in alfalfa populations were demonstrated from these locations. On the basis of karyotypic formula, the populations had 2 types of chromosomes (m, sm), categorizing them in 8 different classes. Assessment of karyotype symmetry was carried out, using various parameters e.g. Stebbins and A1 (Intrachromosomal) and A2 (Interchromosomal) connected to Romero-Zarco categories. The populations were classified by intrachromosomal and interchromosomal differences.

Keywords: Alfalfa (*Medicago sativa* L.), B chromosome, Cytogenetics, Heteromorphic, Karyotype symmetry, Synthetic.

* Corresponding author E-mail: ezarifi@yahoo.com

مقدمه

جمعیت جهان بین سال‌های ۲۰۰۰ تا ۲۰۵۰ با افزایش ۵۰ درصدی به حدود ۹ میلیارد نفر خواهد رسید در نتیجهٔ این افزایش، نیاز غذایی نیز افزایش یافته و محققان کشاورزی را بر آن داشته تا منابع تولید غذا را بهبود ببخشند (Kingston-Smith, Marshall *et al*., 2012). فرآورده‌های دامی از مهم‌ترین منابع تأمین نیاز غذایی انسان بوده و یکی از شاخص‌های پیشرفت یک کشور تلقی می‌شود. به‌منظور افزایش این منابع غذایی نیازمند بهبود منابع تولید علوفه و کیفیت بالای آن‌ها است. درعین‌حال در بسیاری از گونه‌های گیاهی به جهت محدود شدن و یا از بین رفتن تنوع ژنتیکی مطلوب، در توسعه و اصلاح رقم (واریته)ها و رقم‌های ویژه‌ای که صفات با ارزشی را حمل می‌کنند سخت‌تر شده است بنابراین در این فعالیت‌ها، تنوع ژنتیکی مورد نیاز را می‌بایست از رقم‌های محلی و گونه‌های وحشی نزدیک به آن‌ها استفاده کرد و ژن‌های مورد نظر را با به‌کارگیری روش‌های پیشرفته شناسایی و به رقم‌های کشت‌شده منتقل کرد (Güleç, 2010).

یکی از مهم‌ترین گیاهان علوفه‌ای چندساله در همهٔ جهان یونجه (*Medicago sativa* L.) است که به جهت داشتن همزیستی خوب و شناخته‌شده با باکتری‌های ریزوبیوم، از منابع بسیار مهم و مؤثر تثبیت نیتروژن زیستی (بیولوژیکی) و منبع مهم پروتئین برای دام است (Yu et al., 2013).

یونجه "ملکهٔ گیاهان علوفه‌ای" (Russelle, 2001; Veronesi, *et al*, & Huyghe, 2010) در سراسر جهان بیش از ۸۰ میلیون هکتار سطح کشت دارد (Frame, *et al*., 1998; Michaud, *et al*., 1988; Russelle, 2001). این گیاه از یک مجموعه آرایه یا رده‌بندی (تاکسونومیکی) به نام *Medicago sativa–falcata*، که هر دو آرایهٔ (تاکسون) دیپلوئید (۲n=۲x=۱۶) و تتراپلوئید (۲n=۴x=۳۲) را شامل می‌شود منشأ گرفته است (Şakiroğlu, *et al*., 2010; Veronesi *et al*., 2010). در این مجموعه برای طبقه‌بندی و شناسایی آرایه‌ها به روش عمومی از پلوئیدی، رنگ گل، شکل نیام، شکل دانهٔ گرده‌ها استفاده شده است. در این مجموعه، آرایه‌های دیپلوئید عبارت‌اند از؛ *M.sativa* subsp. *falcata* با گل‌های زردرنگ و نیام‌ها یا غلاف‌های داسی شکل، *M.sativa* subsp. *caerulea* با گل‌های بنفش‌رنگ و نیام‌های با کویل‌های پرشمار و آرایهٔ *M.sativa* subsp. *hemicycle* که دورگ (هیبرید) طبیعی آن‌ها بوده و رنگ گل مختلف چندرنگی و غلاف‌ها تا حدی حلقه‌ای دارد (Small & Bauchan, 1984). زیرگونه‌های تتراپلوئید در این مجموعه شامل؛ *M.sativa* subsp.*sativa* (همانندی زیادی به subsp. *caerulea* دارد)، *M.sativa* subsp. *falcata* و دورگ تتراپلوئید *M.sativa* subsp. *varia* هستند (Quiros & Bauchan, 1988).

بررسی‌های ژنتیک یاخته‌ای (سیتوژنتیک) روی یونجه و گونه‌های نزدیک و خویشاوند آن نسبت به دیگر گیاهان زراعی سخت بوده در نتیجه در این زمینه کم‌کار شده است، زیرا در این گیاه کروموزم‌ها بسیار کوچک، طول آن‌ها در یاخته‌های نوک ریشه ۲-۳ میکرومتر، از نظر ریخت‌شناختی (مورفولوژیکی) بسیار همانند به همدیگر، شمار آنها زیاد (۲n=۴x=۳۲)، و اتوتتراپلوئید طبیعی بوده و چهار ژنگان (ژنوم) آن تا حدودی یکسان (Bauchan & Hossain, 1997) می باشد. نخستین شناسایی و تشخیص کروموزوم‌های یونجه در مرحلهٔ پاکیتن (Packytene) توسط Gillies (1970) انجام گرفته است. با به‌کارگیری روش نواربندی C پیشرفتی در بررسی ویژگی‌های کروموزوم‌های بدنی (سوماتیکی) *M.sativa* CV CADL (یونجه دیپلوئید زراعی) (Masoud, *et al*., 1991) و یونجه تتراپلوئید (Bauchan & Hossain, 2001b; Falistocco, *et al*., 1995) به‌دست‌آمده است. اگرچه یونجه اهلی و زراعی اتوتتراپلوئید است (Bauchan & Hossain, 1997)، بیشتر گونه‌های جنس یونجه *Medicago* دیپلوئید (۲n=۲x=۱۶) و عدد پایهٔ کروموزومی x=۸ دارند و اما شش گونه (*M. constricta, M. lesinsii, M. polymorpha, M. praecox, M. rigidula, and M. rigiduloides*) استثناء بوده و عدد پایهٔ کروموزومی x=۷ دارند (Agarwal & Gupta, 1983; Bauchan, 2009; Bingham & McCoy, 1988; Brummer, *et al*., 1999; Hanson, Barnes, Hill, *et al*., 1988). با بررسی مرحلهٔ پاکیتن چگونگی به وجود آمدن گونه‌های ۱۴ کروموزومی را مشخص کرد و نشان داده باشد، این کروموزوم‌ها از جابه‌جایی (ترانسلوکاسیون) دو کروموزوم با حذف سانترومر یکی از آن‌ها نشأت گرفته‌اند (Lesins & Gillies, 1972). وجود کروموزوم‌های خیلی

بزرگ‌تر از نظر اندازه در کاریوتیپ هر یک از این گونه‌ها قابل توجه است (Lesins & Lesins, 1979). با به‌کارگیری روش فلوسایتومتری برای تعیین سطح پلوئیدی روی مجموعهٔ *M.sativa* ssp. *falcata* در ایالات‌متحده، مشخص شد که هر دو سطح پلوئیدی دیپلوئید و تتراپلوئید در مجموعه موجود است (Brummer *et al*., 1999). *Medicago sativa* ssp. *caerulea* از اجداد دیپلوئید (۲n=۲x=۱۶) یونجه *M.sativa* subsp.*sativa* ارائه شده است (Lesins & Lesins, 1979). مجموعهٔ یونجهٔ *Medicago sativa* موجود در کشور ترکیه، سه کلاس قابل تشخیص ریخت‌شناختی (۱) گل‌های بنفش و نیام حلقه‌ای؛ (۲) گل‌های زرد و نیام غیر حلقه‌ای؛ (۳) حد واسط و متشکل از هر دو دارد. در این مجموعه بررسی‌های کروموزومی روی ۳۲۹ گیاه که نمایانگر ۸۷ جمعیت وحشی و ۳۵ کولتیوار یونجه بود انجام گرفت. همهٔ کولتیوارهای گردآوری‌شده در کلاس ریخت‌شناختی (۱) قرار گرفتند و تتراپلوئید (۲n=۴x=۳۲) بودند؛ درحالی‌که گیاهان وحشی هر سه کلاس ریخت‌شناختی را داشتند و هر دو سطح را (دیپلوئید (۲n=۲x=۱۶) و تتراپلوئید (۲n=۴x=۳۲)) را نشان دادند. نمونه‌های دورگ واقع در حد واسط کلاس‌های (۱) و (۲) نیز هر دو سطح پلوئیدی نشان دادند. در بیشتر جمعیت‌ها سطح پلوئیدی گیاهان یکسان بودند، اما در برخی از آن‌ها مخلوطی از هر دو سطح پلوئیدی دیپلوئید (۲n=۲x=۱۶) و تتراپلوئید (۲n=۴x=۳۲) مشاهده شده است. در چندین منطقه جمعیت‌های دیپلوئید و تتراپلوئید در کنار هم رشد می‌یافتند. برخلاف دیپلوئیدها که در مناطق شمالی ترکیه سازگار شدند تتراپلوئیدها پراکنش بیشتری را در همهٔ این کشور نشان دادند (Small & Bauchan, 1984). تغییرپذیری کروموزومی، مانند ایزوکروموزوم‌ها در بازوهای کوتاه کروموزوم‌های شماره ۲ و ۶ یونجه نیز مشاهده شده است (Bauchan & Hossain, 1999a, 1999b). ایزوکروموزوم‌ها، کروموزوم‌های مونوسانتریک با بازوهای همولوگی هستند که تصویر آینه ای یکدیگرند، می باشند (Rieger, *et al*., 1991). ایزوکروموزوم‌ها ظرفیت (پتانسیل) تعیین میزان اثر دُز ژن‌ها را دارند. در بررسی‌های انجام‌شده روی گونه‌های مجموعهٔ *Medicago sativa*، تاکنون در بازوهای بلند کروموزوم‌های آن‌ها ایزوکروموزوم و تلوزوم مشاهده نشده است. گزارشی از وجود کروموزوم‌های B در جنس *Medicago* ارائه شده است (Hossain & Bauchan, 1999)؛ در طول بررسی‌های ژنتیک یاخته‌ای روتین روی نمونه (اکسشن)های گونهٔ دیپلوئید *M.sativa ssp. falcata* Arcangeli، سه گیاهچهٔ منفرد از دو نمونهٔ مختلف، کروموزوم‌های B را در یاخته‌های خود نشان دادند. کروموزوم‌های B به‌طورمعمول کوچک‌تر از کروموزوم‌های نرمال A و به‌طور عمده هتروکروماتینی هستند.

به‌طورمعمول، کروموزوم‌های B میزان زنده‌مانی و پدیدگان (فنوتیپ) یک اندام (ارگانیسم) را تحت تأثیر قرار نمی‌دهند و با کروموزوم‌های A جفت نمی‌شوند، با کند و حذف کردن، پلی میتوز، یا توزیع ترجیحی رفتار میتوز را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Rieger *et al*., 1991). به جهت اینکه *Medicago sativa* spp. دگرکشن (الوگام) هستند، باور بر این است که چندشکلی (پلی مورفیسم)ها ممکن هست درون ژنگان باشد و می‌توان با استفاده از روش‌های مولکولی و نواربندی (بندینگ) آن‌ها را آشکار کرد. با استفاده از داده‌های ریخت‌شناختی و ایزوزایم (Hanson *et al*., 1988; Quiros & Morgan, 1981) و توالی‌های DNA میتوکندری و کلروپلاست (Havananda, *et al*., 2010)، مسیر تکامل مجموعهٔ *M.sativa–falcata* بنا بر Error! Reference source not found. معین شده است. مجموعهٔ *M.sativa–falcate* شامل دسته‌هایی از زیرگونه‌های با دو سطح پلوئیدی است (Veronesi *et al*., 2010) که در شکل ۱ نشان داده شده است. همهٔ اعضاء این مجموعه کاریوتیپ یکسانی را به اشتراک گذاشتند (Gillies, 2009). هر دو سطح پلوئیدی دیپلوئید (۲n=۲x=۱۶) و تتراپلوئید (۲n=۴x=۳۲) در این مجموعه یافت می‌شود. یونجه یک گونهٔ اتوتتراپلوئید (۲n=۴x=۳۲) و دگرگشن است، رقم‌های کشت‌شده ناهمگن هستند (McKersie & Bowley, 1993). گل‌های گیاه یونجه بسیار کوچک بوده و امکان دورگ‌گیری سخت و با صرف زمان بیشتری است، یونجه به‌شدت خود ناسازگار بوده و به جهت چندساله بودن ارزیابی عملکرد در آن، به مدت طولانی نیاز دارد، لذا دورهٔ اصلاحی آن طولانی‌تر از گیاهان یک‌ساله است. از سویی یونجه خیلی به خویش‌آمیزی (اینبریدینگ) حساس است (Katepa-Mupondwa, *et al*., 2002)، به‌طورمعمول پس از

نخستین نسل خودباروری حدود ۴۰درصد از عملکرد علوفه و بذر کاسته می‌شود، این ویژگی یک عامل بازدارنده در تولید رقم‌های دورگ است و وراثت‌پذیری عملکرد علوفه در یونجه کم بوده و محیط روی نژادگان (ژنوتیپ) تأثیری زیاد دارد (Poehlman, 1987). به علت پلی پلوئید بودن، تولید بذر هم به حد وفور صورت نمی‌گیرد لذا، به دلایل یادشده برای اصلاح و بهبود گیاه یونجه از روش رقم‌های ساختگی یا مصنوعی (سنتیتیک) استفاده می‌شود و برای این منظور یعنی تولید رقم مصنوعی می‌بایست در انتخاب همسانه (کلون)ها توجه ویژه‌ای شده و از همه مهم‌تر برای اینکه از خویش‌آمیزی کاهش عملکرد علوفه در امان باشیم از ترکیب نژادگان‌های نزدیک و خویشاوند جلوگیری شود. بدین منظور ضروری هست که همسانه‌های مورد استفاده از نظر ویژگی‌های کروموزومی بررسی‌شده و همسانه‌هایی که از نظر کاریوتیپ روابط دورتری دارند در تولید رقم مصنوعی وارد شوند (Tuğay, 1997).

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

از پوشش‌های گیاهی طبیعی یونجه (*Medicago sativa* L.) واقع در مناطق دریاچه‌ای استان‌های ترکیه (Burdur، Isparta، Afyon و Konya) که در جدول ۱. مختصات جغرافیایی آورده شده است؛ با انتخاب تک بوته شمار ده جمعیت که هر جمعیت شامل چندین نمونه یا فرد بود از این مناطق گردآوری‌شده و خزانهٔ جمعیتی به دست آمد. افراد شماره‌گذاری شده و بر پایهٔ صفات مورد نظر اصلاحی، انتخاب و برای بررسی‌های ژنتیک یاخته‌ای از یاخته‌های بدنی استفاده شده است. از افراد انتخاب‌شده جمعیت‌ها همسانه تهیه و در شرایط گلخانه ریشه‌دار شدند افزون بر اینکه همسانه‌های ریشه‌دار شده در تجزیهٔ کاریوتیپ استفاده و در فضای آزاد برای مشاهدهٔ کارهای اصلاحی نیز کشت شدند. در این تحقیق یک کولتیوار یونجهٔ مراغه (*Medicago sativa* L. CV Maraghe) از ایران نیز استفاده شده است و برای بررسی کروموزوم‌ها از بذرها استفاده شد.

بررسی کروموزوم‌های بدنی

برای بررسی کروموزوم‌های بدنی و تجزیهٔ کاریوتیپ جمعیت‌های یونجه (*Medicago sativa* L.) از مریستم نوک ریشه‌ای ناشی از ریشه‌دار شدن همسانه‌های افراد جمعیت‌ها به شرح زیر استفاده شده است.

برای ریشه‌دار کردن، از شاخه‌های جوان قلمه گردید و در محل سایه درون گلخانهٔ پلاستیکی که به سامانهٔ مه پاش مجهز بود، درون مخلوطی از پرلیت و تورب (۲:۱) کشت داده شد تا ریشه‌دار شود. پس از اینکه همسانه‌های یونجه ریشه‌دار شد گیاهچه‌های به‌دست‌آمده وارد گلدان‌های سیاه ($10\times10\ cm^3$) منتقل شدند (Zarifi & Güloğlu, 2016). از هر جمعیت ۲ تا ۳ همسانه که خیلی خوب رشد کرده بودند انتخاب و برای ادامهٔ ریشه دهی و بررسی‌های کروموزومی با روش ظریفی و گول اوغلو بدون هیچ تغییری استفاده شد (Zarifi & Güloğlu, 2016). با توجه به اینکه مرحلهٔ میتوز در تقسیم یاخته‌ای بسیار کوتاه هست، مشاهدهٔ یاخته‌ها در مرحلهٔ متافاز با نسبت بالا مشکل است. استفاده از مواد و محلول‌های افزاینده نفوذپذیری یاخته‌ها به همراه محلول‌های پیش تیمار مانند؛ دی متیل سولفوکساید (DMSO) باعث نفوذ سریع پیش تیمار به درون‌یاخته شده و مشاهدهٔ کروموزوم‌ها در مرحلهٔ متافاز را با در صد فراوانی بالا امکان‌پذیر می‌کند (Agayev, *et al*., 2010; Mujeeb-Kazi *et al*., 1987). در این تحقیق، میزان ۵۰ قطره از دی متیل سولفوکساید (DMSO) به درون ۴۰۰ میلی‌لیتر محلول پیش تیمار اضافه کرده و ریشه‌ها تیمار شدند، نتایج برجسته‌ای به‌دست‌آمده است. بررسی‌های میکروسکوپی با میکروسکوپ الیمپیوس BX53 ساخت کشور ژاپن انجام و صفحه‌های خوب متافازی کروموزوم‌ها با دوربین دیجیتالی عکس‌برداری شد.

اندازه‌گیری فراسنجه‌های کاریوتیپ

اندازه‌گیری فراسنجه (پارامتر)های کروموزوم‌ها در۱۰-۵ صفحهٔ متافازی بر پایهٔ بزرگنمایی با استفاده از نرم‌افزار MicroMeasure 3.3 (Reeves, 2001) انجام شد. نام‌گذاری و کلاس‌بندی کروموزوم‌ها با توجه به محل سانترومر از روش(Levan *et al*. 1964) استفاده شده است. ویژگی‌های عددی کاریوتیپ جمعیت‌ها؛ بازوی بلند (L)، بازوی کوتاه (S)، نسبت بازوها (Arm ratio)، میانگین طول کروموزوم‌ها، طول نسبی کروموزوم‌ها، شاخص سانترومری و خطای استاندارد با استفاده از نرم‌افزارهای آماری Excell 13 (Microsoft Excell) و

(http://www.ibm.com/analytics/us/en/technology/sps SPSS v16 s) محاسبه شد.

یونجه (*Medicago sativa* L.) با ۲n=۴x=۳۲ کروموزوم اتوتتراپلوئید، هر کروموزوم همتا ۲ جفت (۴ کروموزوم) بوده و بنا بر پیشنهادی (Bauchan & Hossain, 2001b) کاریوتیپ یونجه "African" به‌عنوان کاریوتیپ استاندارد، در این تحقیق برای ایجاد کاریوتیپ جمعیت‌های یونجه و رسم ایدئوگرام و کاریوگرام آن‌ها استفاده شد.

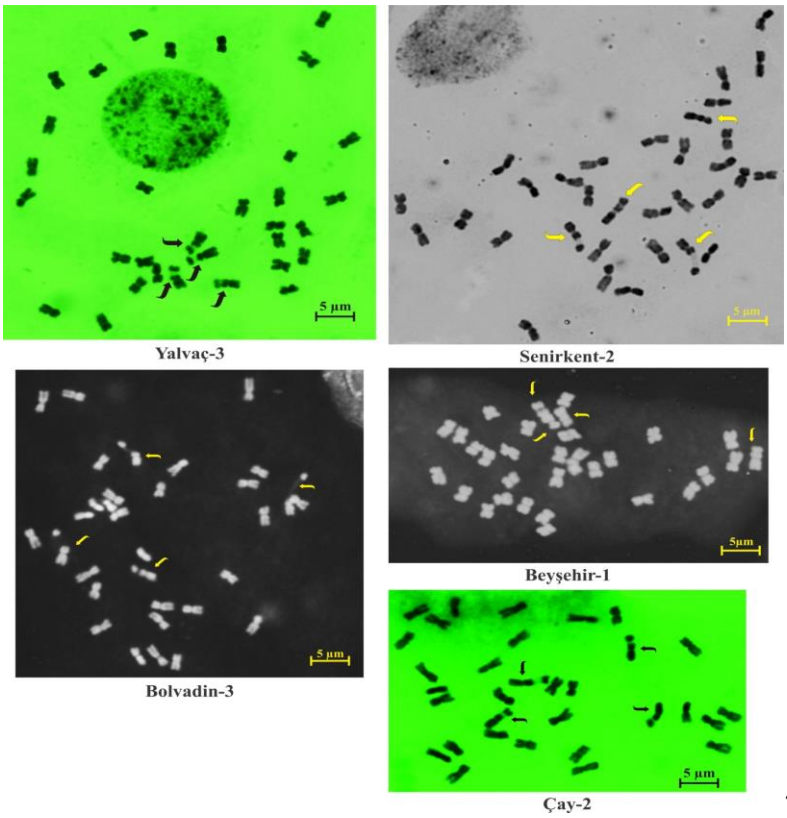
جدول ۱. مختصات جغرافیایی محل‌های گردآوری جمعیت‌های یونجه (*Medicago sativa* L.).

Table.1.The collected locations and geographical coordinate's data of (*Medicago sativa* L.) populations.

No. Fixation	No.	Location	Coordinate	Altitude (m)
290	1	Turkey/ Burdur/ Yeşilova-3	37º 57' 36 K, 29º 86' 75 D	1152 m
301	2	Turkey / Burdur/ Bucak-2	37º 45' 58 K, 30º 51' 05 D	789 m
304	3	Turkey / Isparta/ Eğirdir-2	37º 91' 73 K, 30º 78' 81 D	926 m
310	4	Turkey / Isparta/ Ş. Karaağaç-2	38º 06' 39 K, 31º 40' 51 D	1183 m
316	5	Turkey / Isparta/ Yalvaç-3	38º 21' 89 K, 31º 27' 95 D	1182 m
326	6	Turkey / Isparta/ Senirkent-2	38º 14' 15 K, 30º 61' 29 D	944 m
337	7	Turkey / Afyon/ Çay-2	38º 41' 70 K, 30º 77' 20 D	1019 m
339	8	Turkey / Afyon/ Sultandağı-1	38º 59' 69 K, 31º 00' 18 D	995 m
343	9	Turkey / Afyon/ Bolvadin-3	38º 69' 00 K, 30º 96' 45 D	982 m
346	10	Turkey / Konya/ Beyşehir-1	37º 37' 11 K, 31º 34' 30 D	1154 m

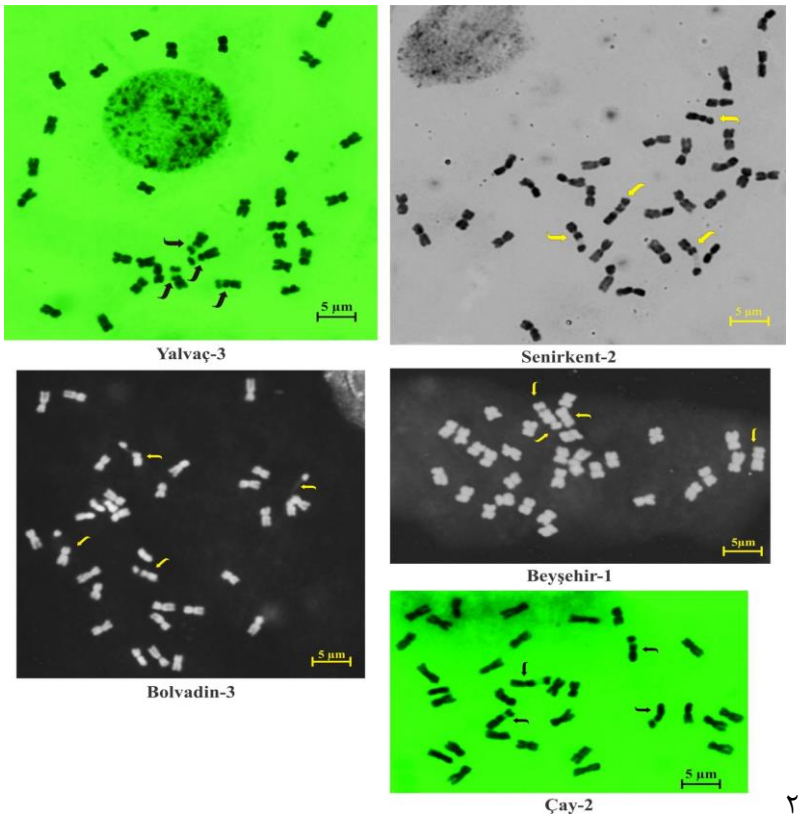
نتایج و بحث

بررسی‌های کروموزومی همهٔ جمعیت‌های گردآوری‌شدهٔ طبیعی یونجه (*Medicago sativa* L.) که با همسانه ازیاد یافته‌اند، اما نمایندهٔ یک جمعیت هستند بنا بر جدول ۲؛ ده نمونه از مناطق بوم‌شناختی (اکولوژیکی) کشور ترکیه و یک نمونهٔ بذری نیز از کشور ایران (شکل ۱)، در این تحقیق با استفاده از روش اسکواش بهبود یافته (Agayev 2002; Agayev *et al*. 2010; Zarifi *et al*. 2005; Zarifi & Güloğlu 2016) بررسی شدند (جدول ۲، ۳ و شکل



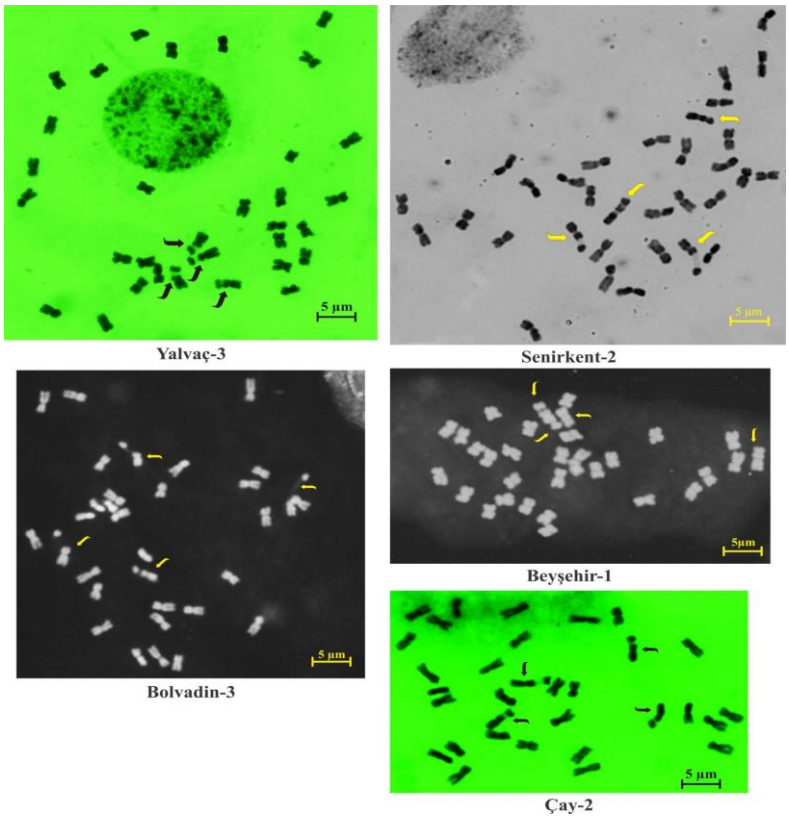
۲

شکل ۳. شمارش کروموزومی همهٔ جمعیت‌ها ۲n=۴x=۳۲ بودند و اتوتتراپلوئید بودن این جمعیت‌ها شناسایی شده و با دیگر گزارش‌های انجام گرفته همخوانی دارد (Bauchan & Hossain 1998b; 2001a; 2001b; 1998a; Bauchan *et al*. 2002; 2003; Masoud *et al*. 1991). ویژگی‌های کاریوتیپ جمعیت‌های مورد بررسی؛ ترکیب کاریوتیپ (جدول ۲)، صفحه گسترهٔ متافازی

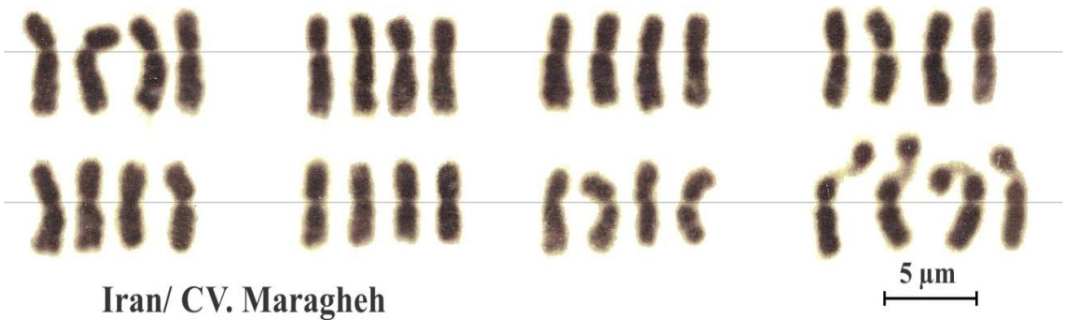


(شکل ۲

شکل ۳) و اندازه‌گیری فراسنجه‌های کاریوتیپ آن‌ها (جدول ۳) خلاصه شده است. رنگ‌آمیزی کروموزوم‌های جمعیت‌های یونجه با استفاده از هماتوکسیلن در روش اسکواش پیشرفته نتایج قابل قبولی را در تشخیص ریخت‌شناختی کروموزوم‌های آن‌ها نشان داده است (Agayev et al. 2010; Zarifi et al. 2005; Zarifi & Güloğlu 2016). شمار کروموزوم‌ها و تتراپلوئیدی بودن جمعیت‌ها تفاوتی را نشان نداده، اما در کاریوتیپ کروموزم‌های بدنی جمعیت‌ها اختلاف‌های اساسی مشاهده شده است (جدول ۲). یونجه (*Medicago sativa* L.) با ۲n=۴x=۳۲ کروموزوم اتوتتراپلوئید، هر کروموزوم همتا ۲ جفت (۴ کروموزوم) بوده و بنا بر پیشنهادی (Bauchan & Hossain, 2001b) کاریوتیپ یونجه "African" به‌عنوان کاریوتیپ استاندارد، در این تحقیق برای ایجاد کاریوتیپ جمعیت‌های یونجه و رسم ایدئوگرام و کاریوگرام آن‌ها استفاده شد. در این تحقیق کاریوتیپ و کاریوگرام نمونهٔ یونجهٔ (CV. Maragheh) مورد بررسی از کشور ایران بل این روش تهیه شده (شکل ۱) و برای مقایسهٔ کاریوتیپ دیگر جمعیت‌ها استفاده شد. در کاریوتیپ همهٔ جمعیت‌ها دو جفت کروموزوم ماهواره (ساتلایت)دار (NOR) یا ماهواره مشاهده شد (کروموزوم شماره ۸). نوع کروموزوم‌های ماهواره دار در این جمعیت‌ها در دو جمعیت (Ş. Karaağaç-2 و Çay-2) متاسانتریک بوده و در دیگر جمعیت‌ها ساب متاسانتریک یا خیلی نزدیک به ساب متاسانتریک بودند. افزون بر این، در کاریوتیپ این جمعیت‌ها ۸ جفت کروموزوم بزرگ متاسانتریک و یا ساب متاسانتریک (کروموزوم‌های ۴-۱)، و ۶ جفت کروموزوم کوچک متاسانتریک (کروموزوم‌های ۷-۵) مشاهده شده است (جدول ۲ و جدول ۳). در ژنگان یونجه کروموزوم شماره ۸ به روش (Bauchan & Hossain, 2001b) و کاریوگرام نمونهٔ کولتیوار ایرانی (CV. Maragheh) در شکل ۱، صاحب NOR یا ماهواره بوده و روی بازوی کوتاه کروموزوم‌ها قرار گرفته است و با گزارش‌های نتایج بررسی‌های (Schlarbaum, *et al*., 1988) یکسان بوده، اما از سوی Masoud *et al*.(1991) گزارش شده است که در ژنگان یونجه، این ماهواره‌ها روی بازوی بزرگ کروموزوم‌ها قرار دارند؛ کروموزوم‌های ماهواره‌دار در تجزیهٔ کاریوتیپ از معیارهای شناسایی و یا نشانگر هستند. نتایج این تحقیق با نتایج برخی از بررسی‌های انجام‌شده همخوانی نداشته (Bauchan & Campbell 1994; Bauchan & Hossain 2001a; 2001b) و در این تحقیق جزئیات کامل کاریوتیپ گیاه یونجه(*Medicago sativa* L.) با استفاده از روش اسکواش پیشرفته در یاخته‌های بدنی ارائه شده است (شکل ۲،



شکل ۳، جدول ۳و۳).



شکل ۱. کاریوگرام نمونهٔ یونجه (CV. Maragheh) از ایران بنا بر روش کاریوتیپ استاندارد (Bauchan & Hossain, 2001b)

Fig.2. Karyogram of alfalfa population of Iran (CV. Maragheh) according to the method of standard karyotype (G. R. Bauchan & Hossain, 2001b)

در ژنگان این گیاهان وجود دو جفت کروموزوم ماهواره‌دار (تتراد کروموزوم) به‌عنوان نشانگر، و ازآنجایی‌که این کروموزوم‌ها از نظر ریخت‌شناختی همانند و جفت هم بودند، اتوتتراپلوئید بودن جمعیت‌ها استنباط شده است. در تحقیق دیگری که روی یاخته‌های بدنی کشت بافت پروتوبلاست یونجه انجام گرفته بود، در کاریوتیپ آن‌ها وجود ۴ کروموزوم ماهواره‌دار همانند این تحقیق گزارش شده و افزون بر این در بعضی از گروه‌های کروموزوم‌ها فرورفتگی ثالثیه را نیز نشان دادند (Schlarbaum *et al.*, 1988).

گسترهٔ متافازی، کاریوگرام و ایدئوگرام هاپلوئیدی کروموزوم‌های بدنی جمعیت‌ها در (شکل ۲) برای مقایسهٔ ریخت‌شناختی کروموزوم‌های آن‌ها نمایش داده و داده‌های فراسنجه‌های کاریوتیب‌ها در جدول ۲ جدول ۳به‌طور کامل ارائه شده است. شاخص‌های نبود تقارن (A1 و A2) کاریوتیپ جمعیت‌ها با استفاده از روش رومرو زارکو (Romero Zarco, 1986) مشخص شده است (Error! Reference source not found.)کلاس‌بندی کاریوتیپ‌ها (SC) بر پایهٔ (Stebbins, 1971) با در نظر گرفتن درجهٔ نامتقارنی در (جدول ۲ و جدول ۳) ارائه شده است. بر پایهٔ این اطلاعات توصیف ویژگی‌های تک‌تک کروموزوم‌ها در زیر آورده شده است. کروموزوم شماره ۸ در جمعیت‌های مورد بررسی ماهواره داشته و به‌کلی مشخص بوده و بنا بر روش (Bauchan & Hossain 2001) و با کاریوگرام جمعیت ایرانی در شکل ۱ در جایگاه آخر کاریوتیپ آورده شده است و بدون توجه به بزرگی و کوچکی این کروموزوم نشانگر (مارکر)، دیگر کروموزوم‌ها از بزرگ به کوچک در کاریوتیپ قرار گرفته و شرح آن‌ها آمده است.

جدول ۲. شمارش کروموزومی و فرمول کاریوتیپ جمعیت‌های یونجه (*Medicago sativa* L) گردآوری‌شده

Table. 2. Chromosome number and karyotype formula of alfalfa (*Medicago sativa* L.) populations

No.	Locations	x	Chromosome No.	Karyotype Formula	SC
1	Turkey/ Burdur/ Yeşilova-3	8	2n= 4x= 32	20 m+ 4sm + 4~sm+ 4sm^{sat}	2B
2	Turkey / Burdur/ Bucak-2	8	2n= 4x= 32	24m+ 4~sm + 4~sm^{sat} + 2B	2B
3	Turkey / Isparta/ Eğirdir-2	8	2n= 4x= 32	28m+ 4~sm^{sat}	2A
4	Turkey / Isparta/ Ş. Karaağaç-2	8	2n= 4x= 32	28m + 4m^{sat}	1B
5	Turkey / Isparta/ Yalvaç-3	8	2n= 4x= 32	28m+ 4sm^{sat}	2B

6	Turkey / Isparta/ Senirkent-2	8	2n= 4x= 32	28m+ 4~sm^{sat}	1B
7	Turkey / Afyon/ Çay-2	8	2n= 4x= 32	24m+ 4sm+ 4m^{sat}	2B
8	Turkey / Afyon/ Sultandağı-1	8	2n= 4x= 32	28m+ 4sm^{sat}	2B
9	Turkey / Afyon/ Bolvadin-3	8	2n= 4x= 32	28m+ 4~sm^{sat}	1A
10	Turkey / Konya/ Beyşehir-1	8	2n= 4x= 32	24m+ 4~sm+ 4sm^{sat}	2A
11	Iran/ CV. Maragheh	8	2n= 4x= 32	24m+ 4sm+ 4sm^{sat}	2A

کروموزوم۱: بزرگ‌ترین کروموزوم در کاریوتیپ جمعیت‌ها بوده و اندازهٔ طول این کروموزوم 0.10 ±5.02 میکرومتر در جمعیت ایران CV. Maragheh و 0.03 ±2.56 میکرومتر در جمعیت Eğirdir-2 متغیر بوده و تفاوت معنی‌داری در بین جمعیت‌ها نشان داد. تیپ این کروموزوم در همهٔ جمعیت‌ها متاسانتریک بوده و اما در جمعیت‌های Yeşilova-3 به‌طورکلی ساب متاسانتریک (Levan *et al.* 1964) بوده و در جمعیت Bucak-2 تا حدودی ساب متاسانتریک و نسبت بازوها (AR=L/S) در این جمعیت 0.06 ±1.65 است. تغییر زیادی در همتاها و نیم‌همتا (همیولوگ)ها در این کروموزوم بین جمعیت‌ها مشاهده شده است که پیشتر گزارش نشده است.

به‌کار بردن "تا حدودی ساب متاسانتریک" برای تیپ کروموزوم‌ها در این تحقیق، به جهت این است که از نظر میانگین اعداد متافازهای مورد استفاده برای تجزیهٔ کاریوتیپ تفاوت کمتری با لوان داشته و بیشتر متافازهای مورد تجزیهٔ تیپ کروموزوم را ساب متاسانتریک نشان داده است و شاید هم از تفاوت و تغییرهای به‌دست‌آمده در همتاها و نیم‌همتاها شده باشد و همچنین پدیده‌های دیگری مانند ناهمگنی قابل توجه در جمعیت‌ها که در این تحقیق در قسمت‌های دیگر به آن اشاره شده است.

کروموزوم۲: این کروموزوم در جمعیت‌ها از نظر اندازه تفاوت کمی را نسبت به کروموزوم شماره ۱ نشان داده است و تیپ این کروموزوم در جمعیت‌ها متاسانتریک بوده ولی در دو جمعیت CV. Maragheh و Çay-2 ساب متاسانتریک است. اندازهٔ طول کروموزوم 0.06 ±4.80 میکرومتر در جمعیت ایران CV. Maragheh و 0.04 ±2.47 میکرومتر در جمعیت Eğirdir-2 متغیر بوده است. عدد نسبت بازوها (AR=L/S) در جمعیت‌ها 0.04 ±1.23 تا 0.02 ±1.73 متغیر بود. در همتاها و نیم‌همتاها تغییر دیده شده است.

کروموزوم۳: در همهٔ جمعیت‌ها تیپ این کروموزوم متاسانتریک بوده و اندازهٔ طول کروموزوم باز هم در جمعیت CV. Maragheh (0.05 ±4.63 میکرومتر) بیشترین و در جمعیت Eğirdir-2 (0.04 ±2.39) کمترین را است. نسبت بازوها (AR=L/S) در جمعیت‌ها 0.05 ±1.18 تا 0.03 ±1.28 متغیر بود. تغییرپذیری در همتاها و نیم‌همتاها به‌ندرت رخ داده است.

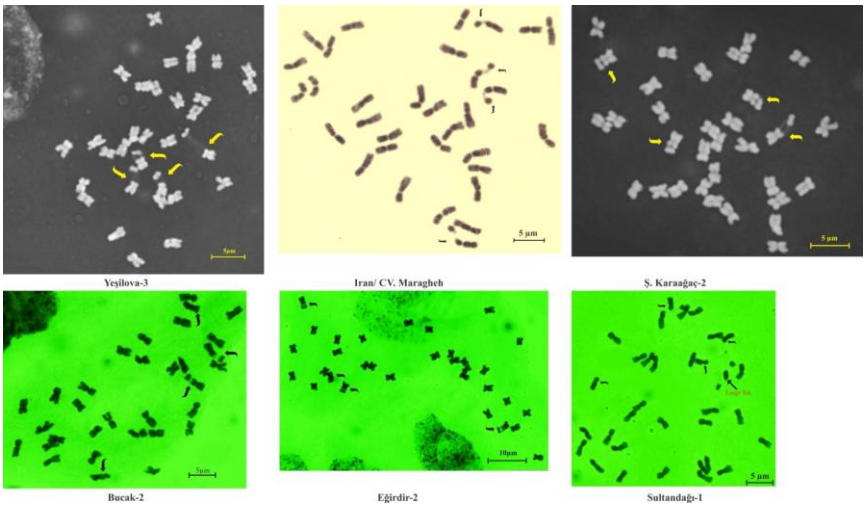
کروموزوم ۴: نسبت بازوها (AR=L/S) در جمعیت‌ها برای این کروموزوم 0.04 ±1.17 تا 0.05 ±1.65متغیر بود. تیپ کروموزوم در جمعیت‌ها متاسانتریک بوده اما در دو جمعیت Yeşilova-3 (**1.62± 0.05**) و Beyşehir-1 (±1.65 0.05) ساب متاسانتریک مشاهده شده است. جمعیتی که بزرگ‌ترین اندازهٔ طول کروموزوم را داشت جمعیت CV. Maragheh (0.05 ±4.58 میکرومتر) و کوچک‌ترین اندازهٔ طول کروموزوم در جمعیت Eğirdir-2 (0.04 ±2.31) بود. در این کروموزوم نیز تغییر در همتاها و نیم‌همتاهای برخی از جمعیت‌ها به‌طور آشکار قابل مشاهده بود.

کروموزوم۵ و۶: این کروموزوم‌ها در همهٔ جمعیت‌ها هم از نظر اندازه خیلی همانند به هم بودند و هم از نظر تیپ که همهٔ متاسانتریک بودند. نسبت بازوها (AR=L/S) در جمعیت‌ها به یک خیلی نزدیک بودند و اما در جمعیت Sultandağı-1 این عدد 0.09 ±1.59 به‌دست‌آمده که کمی بیشتر است و نشان می‌دهد در بازوهای این جمعیت تغییری صورت گرفته است، همین رخداد در دیگر جمعیت‌ها در دیگر کروموزوم‌ها نیز مشاهده شده است. بزرگ‌ترین اندازهٔ طول کروموزوم‌ها مربوط به جمعیت ایران CV. Maragheh و کوچک‌ترین اندازهٔ طول کروموزوم در جمعیت Eğirdir-2 مشاهده شده است.

کروموزوم۷: کوچک‌ترین کروموزوم از نظر اندازه در جمعیت‌ها است که تفاوت فاحشی را نسبت به دیگر کروموزوم‌ها دارد و خیلی کوچک هستند و از نظر

ریخت‌شناختی و تیپ که همگی متاسانتریک هستند به‌آسانی قابل تشخیص هستند. این کروموزوم‌ها نیز می‌توانند به‌عنوان نشانگر کروموزومی باشند. همهٔ همتاها برخلاف دیگر کروموزوم‌ها همانند هم بوده و تفکیک آن‌ها از روی ظاهر سخت بوده و تغییرپذیری در آن‌ها به‌ندرت رخ داده و در همهٔ جمعیت‌ها و بوم‌جور (اکوتیپ)ها ثابت هستند. جمعیتی که بزرگ‌ترین اندازهٔ طول کروموزوم را داشت باز هم جمعیت CV. Maragheh (4.02± 0.08 میکرومتر) و کوچک‌ترین اندازهٔ طول کروموزوم در جمعیت Eğirdir-2 (1.97± 0.03) بود. نسبت بازوها (AR=L/S) در جمعیت‌ها به یک خیلی نزدیک هستند.

کروموزوم۸: این کروموزوم مهم‌ترین و متمایزکننده‌ترین کروموزوم در بین جمعیت‌ها است. کروموزوم ماهواره‌دار یا ماهواره‌دار در جمعیت‌ها بوده و همهٔ چهار کروموزوم ماهواره (تتراد کروموزوم) کامل قابل تشخیص و اندازه‌گیری بوده است. این کروموزوم تغییر زیادی را در جمعیت‌ها نشان داده است. اندازه‌های متفاوت ماهواره و تغییرپذیری تیپ کروموزم قابل توجه بوده و از سویی تغییر در همتاها و نیم‌همتاها قابل مشاهده بود.

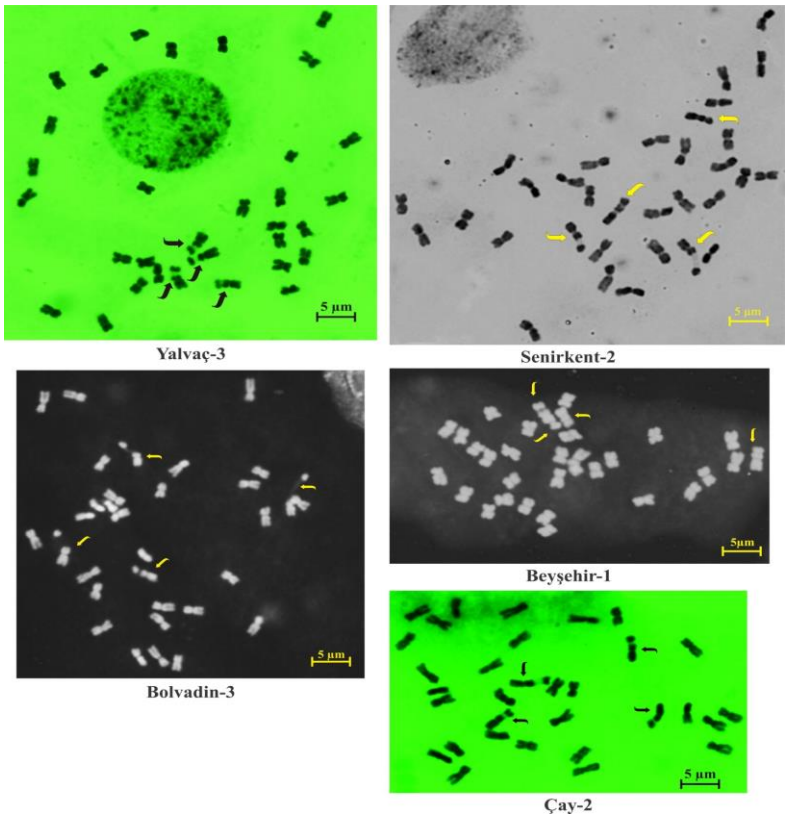


شکل ۲. یاخته های سوماتیک جمعیت‌های یونجه (*Medicago sativa* L.) که با کلون افزونش شدند و ۲n=۴x=۳۲ کروموزوم را نشان می‌دهند. کروموزوم‌های ماهواره‌دار با فلش ها نشان داده شده است. فلش نازک در جمعیت Sultandağı-1 ماهواره یا ماهواره بزرگ را نشان می‌دهد.

Fig. 3. Somatic chromosomes of cloned (*Medicago sativa* L.) populations, 2n=4x=32. Arrows indicate satellite chromosomes

همهٔ ماهواره‌ها روی بازوی کوتاه کروموزوم‌ها قرار گرفته و اندازهٔ آن گاهی هم‌اندازه، بیشتر یا نزدیک دو برابر اندازهٔ بازوی کوتاه است. تیپ کروموزوم بیشتر ساب متاسانتریک و یا نزدیک به ساب متاسانتریک به جهت تغییر در همتاها و نیم‌همتاها و تنها در دو جمعیت Çay-2 و Ş. Karaağaç-2 متاسانتریک هست. نسبت بازوها (AR=L/S) در جمعیت‌ها 1.44± 0.03 (Ş. Karaağaç-2) تا 2.06± 0.14 (Sultandağı-1) متغیر بود و این تغییرها به‌نسبت زیاد است.

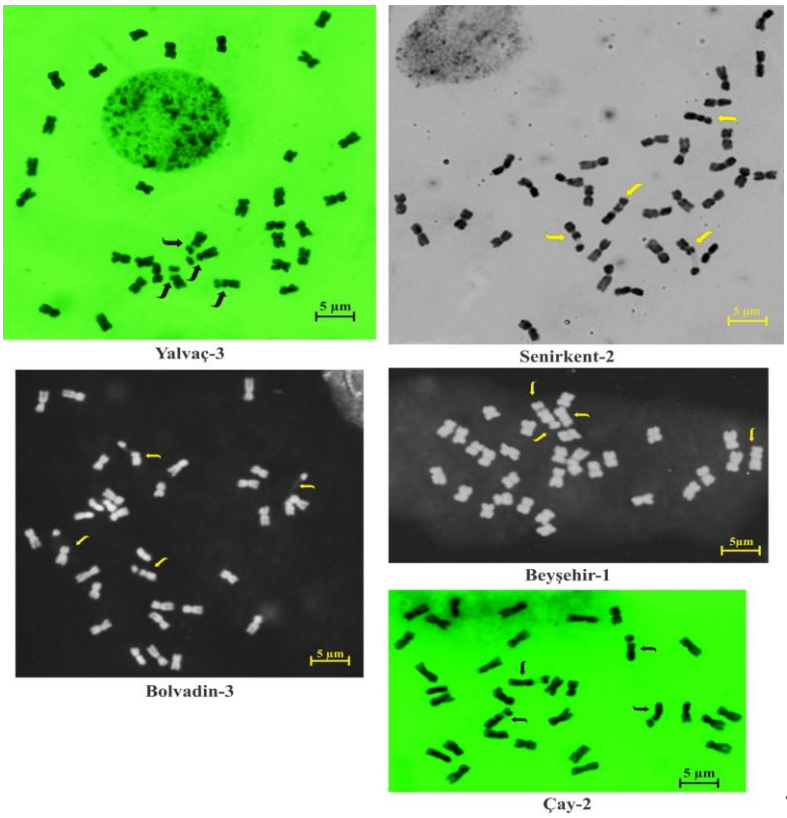
اندازهٔ طول کروموزم با احتساب اندازهٔ ماهواره بیشتر از دیگر کروموزوم‌ها بوده و همانند دیگر کروموزوم‌ها جمعیت CV. Maragheh بیشترین و جمعیت Eğirdir-2 کمترین اندازهٔ طول را داشتند. بزرگ‌ترین ماهواره در جمعیت‌های CV. Maragheh و Sultandağı-1 به ترتیب 1.35 و 1.4 میکرومتر مشاهده شده است. چنین به نظر می‌رسد که اثر تغییر موجود در دیگر کروموزوم‌ها در این کروموزوم ماهواره‌دار بیشتر ظاهرشده و تنوع اندازهٔ ماهواره و تیپ این کروموزوم مؤید این است.



شکل ۳. یاخته های سوماتیک جمعیت‌های یونجه (*Medicago sativa* L.) که با همسانه افزونش شدند و ۲n=۴x=۳۲ کروموزوم را نشان می‌دهند. کروموزوم‌های ماهواره‌دار با فلش ها نشان داده شده است.

Fig. 4. Somatic chromosomes of cloned (*Medicago sativa* L.) populations, 2n=4x=32. Arrows indicate satellite chromosomes.

با توجه به گزارش‌های پیشین، بررسی‌های ژنتیک یاخته‌ای روی یونجه (*M.sativa* ssp.*sativa* (L.) L & L) و گونه‌های نزدیک و خویشاوند آن به دلیل چهار عامل از دیگر محصولات زراعی عقب مانده است؛ ۱. کروموزم‌های بسیار کوچک، طول آن‌ها در یاخته‌های نوک ریشه ۲-۳ میکرومتر، ۲. از نظر ریخت‌شناختی کروموزوم‌ها بسیار همانند به هم هستند، ۳. شمار کروموزم‌های یونجه (*Medicago sativa* L.) زراعی زیاد (۲n=۴x=۳۲)، و ۴. یونجهٔ اتوتتراپلوئید طبیعی که چهار ژنگان تا حدودی یکسان و ژنتیک پیچیده. به خاطر همین ساختار ژنتیکی اتوتتراپلوئید یونجه محققان گونه‌های دیپلوئید را برای تحقیق کروموزوم‌ها ترجیح داده‌اند و بررسی‌های خودشان را روی آن‌ها انجام دادند. زیرگونهٔ دیپلوئید (*Medicago sativa* ssp. *caerulea* (Less, ex (Ledeb.). Schmalh. مربوط به یونجهٔ تتراپلوئید زراعی به جهت اینکه کروموزوم‌های بدنی و کاریوتیپ این زیرگونه یک جفت کروموزوم ماهواره‌دار (NOR) یا ماهواره در کروموزوم شماره ۸، و ۴ جفت کروموزوم ساب متاسانتریک در کروموزوم‌های شماره ۴-۱، سه جفت کروموزوم کوچک متاسانتریک در کروموزوم‌های ۷-۵ دارد (Bauchan & Hossain, 2001a; Bauchan & Campbell, 1994) و در مقایسه با کاریوتیپ جمعیت‌های مورد بررسی (شکل



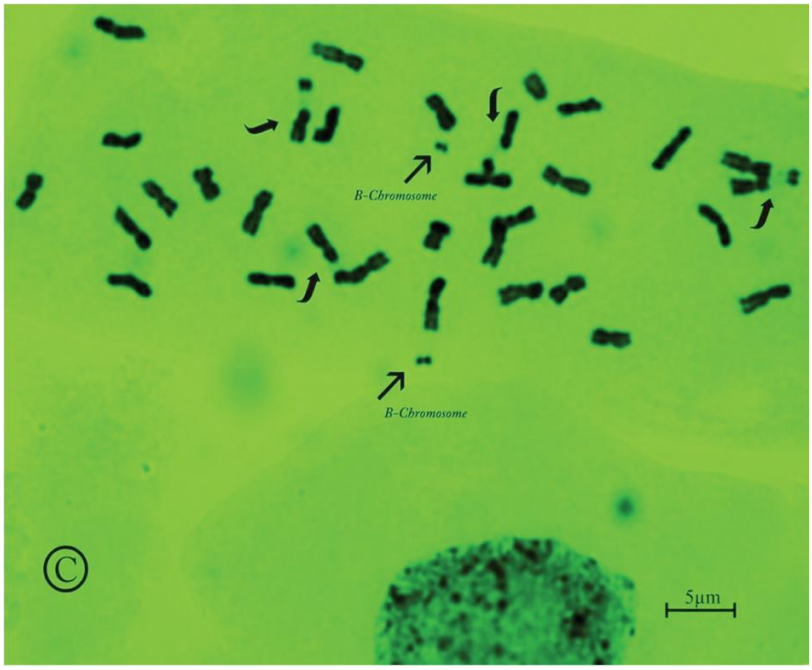
شکل ۳ و ۲

شکل ۵) و جدول ۳ در این تحقیق و وجود همانندی زیاد کاریوتیپی و کروموزومی، از اجداد یونجه (*Medicago sativa* L.) در نظر گرفته می‌شود. یونجه اهلی و زراعی (*Medicago sativa* L.)، در نتیجهٔ نبود کاهشی گامت‌های (۲x) زیرگونه‌های این گیاه و همراه با پلی پلوئیدی شدن به‌دست‌آمده است و دیگر تحقیقات و گزارش‌ها نیز این را اثبات کرده است (McCoy & Bingham, 1988; Pfeiffer & Bingham, 1983). با دورگ گیری سطوح مختلف پلوئیدی امکان انتقال ذخایر توارثی (ژرم پلاسم) یونجه اثبات شده است (Bingham, 1968; Bingham & Saunders, 1974). در این بررسی ژنتیک یاخته‌ایی روی جمعیت‌های مختلف یونجه (*Medicago sativa* L.) از مناطق متفاوت بوم‌شناختی ترکیه (جدول ۱) به پدیدهٔ وجود کروموزوم‌های B در یک جمعیت برخورد کردیم. کروموزوم‌های B به‌طور عمده از کروموزوم‌های A کوچک‌تر بوده و هتروکروماتینی هستند. در حالت معمول وجود این کروموزوم‌ها زندگی و پدیدگان موجود را تحت تأثیر قرار نمی‌دهند، با کروموزوم‌های A جفت‌وجور نمی‌شوند، شمار آن‌ها در گونه‌ها و جمعیت‌ها متفاوت بوده و رفتار میوزی (نبود همتا) و میتوزی (جدا نشدن کروماتید در آنافاز) را با تأخیر، حذف، پلی میتوزی و توزیع ترجیحی تحت تأثیر قرار می‌دهند (Camacho, *et al*., 2000).

جدول ۳. جزئیات کاریوتیپ جمعیت‌های یونجه (*Medicago sativa* L) بررسی‌شده؛ فرمول کاریوتیپ (KF)، میانگین طول کروموزوم (میانگین (TL))، اندازهٔ ماهواره (SAT)، طول کل کروموزوم مجموعهٔ هاپلوئیدی (TC)، دامنهٔ اندازهٔ کروموزوم‌ها (Interval)، A1 شاخص نامتقارن درون کروموزومی (intrachromosomal asymmetry) و A2 شاخص نامتقارن میان کروموزومی (interchromosomal asymmetry) (Romero Zarco, 1986)، شاخص سانترومری (CI)، کلاس‌بندی کاریوتیپ‌ها بر پایهٔ درجهٔ نامتقارنی (SC) (Stebbins, 1971)، درصد شکل کلی کاریوتیپ (TF%) (Huziwara, 1962)، ضریب تغییرات (CV%)، شاخص درجهٔ نامتقارنی کاریوتیپ (AI) (Watanabe, Yahara, Denda, & Kosuge, 1999)، شاخص پراکندگی کاریوتیپ (DI) (Lavania & Srivastava, 1992, 1999) و اختلاف دامنهٔ طول نسبی کروموزوم‌ها (DRL).

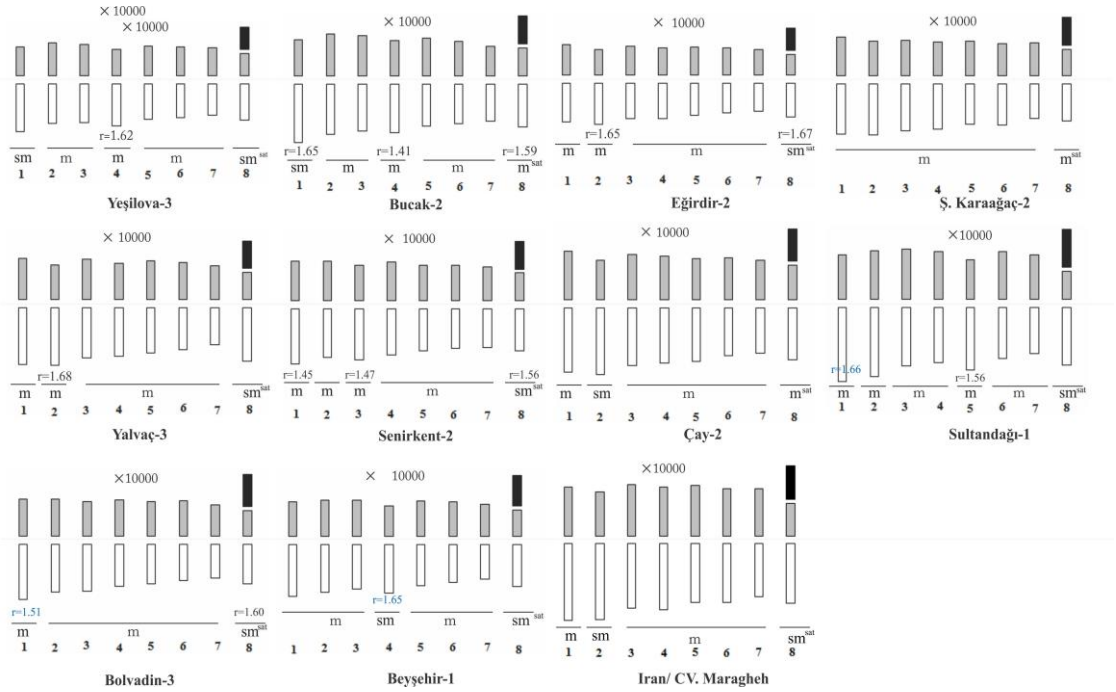
Table. 3. Karyotype details of studied alfalfa populations (*Medicago sativa* L.); Karyotype formula (KF), The mean length of chromosomes (TL), size of satellite (SAT), Total length of haploid set chromosomes (TC), Range of chromosomes size (Interval), A1; intrachromosomal asymmetry and A2; interchromosomal asymmetry (Romero Zarco, 1986), Centromer index (CI), Symmetry class (SC) (Stebbins 1971), The total form percent (TF%) (Huziwara 1962), Coefficient of variation (CV %), The karyotype asymmetry index (AI) (Watanabe et al. 1999), The dispersion index (DI) (Lavania & Srivastava 1992; Lavania & Srivastava 1999) and difference of range of relative length (DRL).

Population	KF	Mean (TL)	Interval	TC	CI	SAT	CV %	AI	A_1	A_2	DRL	TF%	DI	SC
Yeşilova-3	20 m+ 4sm + 4~sm+ 4sm^{sat}	2.56± 0.04	1.69- 3.69	20.47± 0.084	41.45	0.82	14.91	0.142	0.251	0.096	3.15	41.01	6.185	2B
Bucak-2	24m+ 4~sm + 4~sm^{sat} + 2B	3.14± 0.06	2.12- 4.57	25.11± 0.140	41.83	1.03	17.54	0.128	0.231	0.126	4.63	41.43	7.337	2B
Eğirdir-2	28m+ 4~sm^{sat}	2.36± 0.03	1.83- 3.19	18.88± 0.095	42.04	0.82	12.04	0.123	0.226	0.112	4.54	41.44	4.994	2A
Ş. Karaağaç-2	28m + 4m^{sat}	2.97± 0.06	1.94- 4.35	23.79± 0.104	41.72	1.03	18.31	0.127	0.237	0.097	3.63	41.21	7.982	1B
Yalvaç-3	28m+ 4sm^{sat}	3.28± 0.07	1.73- 5.20	26.21± 0.150	41.30	1.02	20.78	0.142	0.255	0.127	5.23	40.56	8.488	2B
Senirkent-2	28m+ 4~sm^{sat}	3.13± 0.07	2.05- 5.04	28.38± 0.163	42.09	1.02	21.83	0.122	0.224	0.107	3.67	41.72	8.768	1B
Çay-2	24m+ 4sm+ 4m^{sat}	3.74± 0.08	2.44- 5.93	29.90± 0.151	41.58	1.18	21.63	0.135	0.245	0.115	4.30	41.03	8.957	2B
Sultandağı-1	28m+ 4sm^{sat}	3.99± 0.12	2.50- 5.82	31.95± 0.149	41.22	1.40	23.64	0.138	0.252	0.105	3.82	40.41	8.515	2B
Bolvadin-3	28m+ 4~sm^{sat}	2.99± 0.05	2.18- 4.24	24.00± 0.145	42.63	1.19	13.55	0.109	0.208	0.134	5.13	41.58	5.842	1A
Beyşehir-1	24m+ 4~sm+ 4sm^{sat}	2.98± 0.04	2.24- 4.35	23.83± 0.121	41.51	1.13	13.89	0.134	0.242	0.115	4.71	40.85	5.756	2A
Iran/ CV. Maragheh	24m+ 4sm+ 4sm^{sat}	4.58± 0.07	3.88- 5.37	36.65± 0.131	40.71	1.35	8.349	0.152	0.270	0.080	2.24	40.33	3.473	2A



شکل ۴. حضور دو کروموزوم B درگسترهٔ متافازی جمعیت Bucak-2 ترکیه (2n=4x=32+2B)، کروموزوم‌های B با فلش نازک در روی شکل و کروموزوم‌های ساتلایت‌دار با فلش پر رنگ نشان داده شده است.

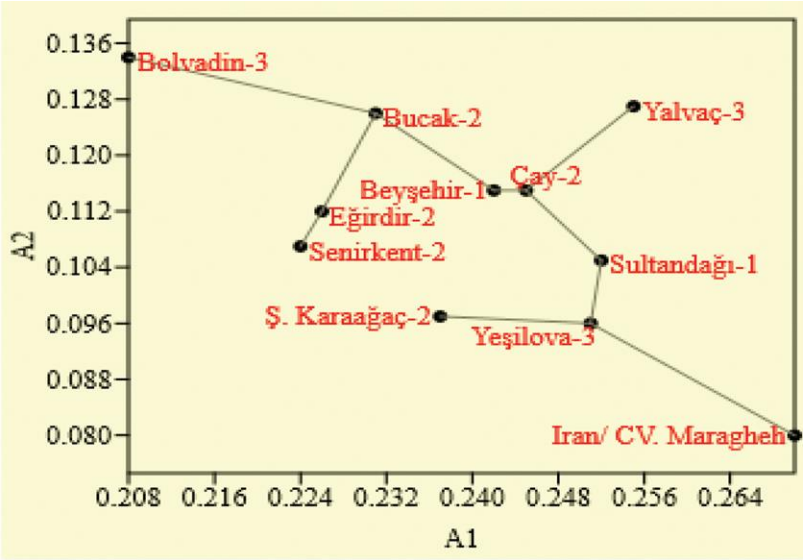
Fig. 6. The presence of two B chromosomes in metaphase plate of Bucak-2 population from Turkey (2n=4x=32+2B), B chromosomes and satellited chromosomes were shown in picture by narrow arrows and bold arrows respectively.



شکل ۵. ایدئوگرام هاپلوئیدی جمعیت‌های یونجه (*Medicago sativa* L.) ۲n=۴x=۳۲ مورد بررسی، m: متاسانتریک و sm: ساب متاسانتریک، ایدئوگرام تفاوت اندازه در کروموزوم‌های جمعیت‌ها را نشان می‌دهد.

Fig. 5. Haploid ideogram of studied alfalfa population (*Medicago sativa* L.) 2n=4x=32, Ideograms reflect size differences among the populations

این کروموزوم‌ها تنها در جمعیتی که از منطقهٔ Bucak-2 ترکیه گردآوری‌شده بود مشاهده و شمار آن‌ها دو عدد بود (شکل ۴). در دیگر جمعیت‌ها کروموزوم B مشاهده نشده اما در ریخت‌شناختی کروموزوم‌ها تفاوت زیادی آشکار شده است. وجود پدیده‌ای کروموزوم B در جنس یونجه *Medicago* پیشتر توسط (Hossain & Bauchan, 1999) گزارش شده است.



شکل ۶. نمودار پراگندگی شاخص‌های نبود تقارن A1 و A2 (Romero Zarco, 1986) جمعیت‌های یونجه (*Medicago sativa* L.) .

Fig. 7. Scatter diagram for studied alfalfa populations (*Medicago sativa* L.) based on A1 and A2 asymmetry parameters (Romero Zarco 198).

شناسایی تک‌تک کروموزوم‌های جمعیت‌های یونجه (*Medicago sativa* L.) با استفاده از روش اسکواش بهبود یافته توسط (Agayev 2002; Agayev *et al*. 2010; Zarifi *et al*. 2005; Zarifi & Güloğlu 2016) و آشکار کردن تغییر و تنوع در ساختار کروموزومی این جمعیت‌ها امکان‌پذیر شده و پدیده‌های متفاوتی که در تکامل کاریوتیپ نقش دارند، شناسایی می‌شود. از پدیده‌های مهم افزون بر کروموزوم‌های B وجود کروموزوم‌های ناجور یا دگرشکل (هتروموزم) در کروموزوم‌های همتا بود که از نظر تیپ این کروموزوم‌ها متفاوت بودند و تیپ‌های متاسانتریک و ساب متاسانتریک در تترادهای همتا مشاهده شده است. این رخداد بسیار نادر بوده و پیشتر گزارش نشده است. در همتای کروموزم‌های شماره ۱ ،۲ ،۳ و۴ و گاهی در کروموزوم‌های ماهواره‌دار این پدیده به‌طور آشکار مشاهده شده است. تغییرپذیری تیپ کروموزوم‌ها در جمعیت‌های مورد بررسی متأثر از فرایندهای تکامل کروموزومی؛ جابه‌جایی، وارونگی، حذف و تکراری مؤید این نتیجه است. این تفاوت‌های موجود در سطح کروموزوم جمعیت‌ها مانند کروموزوم B، کروموزوم دگرشکل، کروموزوم‌های با تیپ‌های مختلف به‌ویژه تیپ ساب متاسانتریک در همتاهای ۱، ۲ ،۳ و۴ و تفاوت اندازهٔ ماهواره در کروموزوم‌های جمعیت‌ها دلیل دگرگشنی و ناهمگن بودن این جمعیت‌ها را نیز بیان می‌کند و این پدیده پیشتر توسط McKersie & Bowley (1993) گزارش شده است.

تقارن و نبود تقارن کاریوتیپ و تفاوت آن در جمعیت‌های یونجه (*Medicago sativa* L.) از روش (Romero Zarco, 1986) (Error! Reference source not found.) به‌صورت دیاگرام نشان داده است. میزان A1 در این بررسی از 0.21 تا 0.27 متغیر بود. کمترین میزان A1 مربوط به جمعیت Bolvadin-3 ، متقارن‌ترین کاریوتیپ و جمعیت‌های Sultandağı-1، Yalvaç-3 و CV. Maragheh با داشتن بیشترین میزان نامتقارن‌ترین کاریوتیپ را صاحب هستند (Error! Reference source not found.). با توجه به داده‌های A1، در جمعیت‌های Sultandağı-1، Yalvaç-3 و CV. Maragheh، تفاوت درون کروموزومی (intrachromosomal) بالا بوده (تفاوت در بازوهای کروموزوم) و برعکس این رخداد در جمعیت Bolvadin-3 رخ داده است. در بررسی فراسنجهٔ A2، میزان آن در جمعیت‌های مورد بررسی از 0.080 تا 0.134 متغیر بود. بیشترین میزان A2 در جمعیت‌های Bolvadin-3 ، Yalvaç-3، Bucak-2 و Çay-2 مشاهده شده است. بنابراین تفاوت طول در کروموزوم‌های مختلف این جمعیت‌ها بیشتر بوده است. اما برعکس در جمعیت‌های CV. Maragheh، Ş. Karaağaç-2 و Yeşilova-3 میزان A2 کمتر بوده و تفاوت کمتری در بین طول کروموزوم‌هایشان مشاهده شده است.

نتیجه‌گیری کلی

در این تحقیق به‌منظور تولید رقم‌های مصنوعی از منابع ژنتیکی یونجه‌های (*Medicago sativa* L.) سازگار شده در شرایط آب و هوایی مناطق آناتولی میانی کشور ترکیه، ویژگی‌های کاریوتیپ ده جمعیت همسانه‌ای مهم انتخاب‌شده از ۲۲ منطقه و یک جمعیت از ایران بررسی‌شده است. تعیین همانندی‌ها و تفاوت‌های کروموزومی جمعیت‌ها و انتخاب ویژگی‌های برجسته و موردپسند در مراحل بعدی برنامه‌ریزی فرایندهای دورگ گیری، پلی کراس و منبع مصنوعی استفاده می‌شود. بررسی‌های ژنتیک یاخته‌ای روی یونجه و گونه‌های نزدیک و خویشاوند آن به جهت مشکلات عدیده‌ای سخت بوده است (Bauchan & Hossain, 1997)، این تحقیق در توسعهٔ علم و تهیهٔ روش‌های بررسی ژنتیک یاخته‌ایی روتین و مؤثر در ارزیابی منابع ژنتیکی بانک ژن‌ها و منابع طبیعی به‌ویژه ذخایر توارثی یونجه (*Medicago sativa* L.) کمک مؤثری است. جمعیت‌های یونجه (*Medicago sativa* L.)مورد بررسی ۲n=۴x=۳۲ کروموزوم داشته و اتوتتراپلوئید بودند و تفاوتی در شمار نشان ندادند. مهم‌ترین کروموزوم نشانگر در گونه‌ها و جمعیت‌ها، وجود کروموزوم ماهواره‌دار(NOR) یا مناطق سازمان‌دهندهٔ هستکی است که محل قرار گرفتن این قسمت از کروموزوم در بازوهای کروموزوم نیز از ویژگی‌های تمایز کننده است. در جمعیت‌های یونجهٔ بررسی‌شده دو جفت ماهواره روی بازوی کوتاه کروموزوم شماره ۸ مشاهده شده است و از نظر اندازهٔ بین جمعیت‌ها اختلاف نشان داده است. تیپ کروموزوم‌های صاحب ماهواره (NOR) به غیر از دو جمعیت Ş. Karaağaç-2 و Çay-2 که متاسانتریک (m) بودند در دیگر جمعیت‌ها ساب متاسانتریک (sm) مشاهده شدند.

تغییر و تنوع در ساختار کروموزومی این جمعیت‌ها از جمله کروموزوم‌های دگرشکل در کروموزوم‌های همتا بود که از نظر

تیپ این کروموزوم‌ها متفاوت بودند و تیپ‌های متاسانتریک و ساب متاسانتریک در تترادهای همتا مشاهده شده است. این رخداد بسیار نادر بوده و پیشتر گزارش نشده است. در همتا کروموزم‌های شماره ۱ ،۲ ،۳ و۴ و گاهی در کروموزوم‌های ماهواره‌دار این پدیده به‌طور آشکار مشاهده شده است. تغییر تیپ کروموزوم‌ها در جمعیت‌های مورد بررسی متأثر از فرایندهای تکامل کروموزومی؛ جابه‌جایی، وارونگی، حذف و تکراری و یا از بین رفتن میزان هتروکروماتین DNA مؤید این نتیجه است و در این تحقیق گرایش میزان نسبت بازوها از متاسانتریک به ساب متاسانتریک که در جدول ۳، جدول ۲ و

شکل ۵ نشان داده شده است و در برخی از جمعیت‌ها مشاهده شده این پدیده را نشان می‌دهد. از سویی از تغییر تیپ‌های کروموزوم چنین استنباط می‌شود که با توجه به اینکه مناطق آناتولی میانی کشور ترکیه از خاستگاه‌های یونجه است و انواع گونه‌های دیپلوئید و رقم‌های تتراپلوئید مدت‌های طولانی در این محل با تغییر در ژنگان خودشان سازگار شده‌اند و هنگامی بین گونه‌های دیپلوئید و تتراپلوئید دورگ‌گیری طبیعی رخ می‌دهد ما تغییرپذیری‌ها را در ساختار کروموزومی نتاج مشاهده می‌کنیم.

در مناطق آناتولی میانی کشور ترکیه به‌ویژه در مناطق دریاچه‌ای این کشور که این تحقیق در آنجا اجرا شده است به جهت وجود تنوع اجتماعات زنبورها، دگرگشنی در جمعیت‌ها و گونه‌های یونجه در این مناطق تشویق و آسان شده است. با بهره‌گیری از ریخت‌شناختی کروموزوم‌های این جمعیت‌ها، می‌توان منشأ یونجه‌های تتراپلوئید را از گونه‌های دیپلوئید و یا زیرگونه‌های آن‌ها استنباط کرد.

کروموزوم‌های ماهواره‌دار در جمعیت‌های یونجه مورد بررسی در شماره ۸، از نظر اندازهٔ طول تنوع بین آن‌ها نشان داده است و این تنوع با تغییر تیپ کروموزوم‌ها در همتاهای ۱، ۲ ،۳ و۴ متناسب بود و هرگاه اندازهٔ طول ماهواره بزرگ‌تر و یا هم‌اندازهٔ طول بازوی کوتاه در شماره ۸ بود تیپ این کروموزوم‌ها به سمت ساب متاسانتریک متمایل می‌شد. در یازده جمعیت یونجه (*Medicago sativa* L.)مورد بررسی تنها در جمعیت Bucak-2 کروموزوم B، مشاهده شد که شمار این کروموزوم‌ها دو عدد بود. این تفاوت‌های موجود در جمعیت‌ها مانند کروموزوم B، دگرشکل و کروموزوم‌های با تیپ‌های مختلف به‌ویژه تیپ ساب متاسانتریک در همتاهای ۱، ۲ ،۳ و۴ و تفاوت اندازهٔ ماهواره در کروموزوم‌های جمعیت‌ها دلیل دگرگشنی و ناهمگن بودن این جمعیت‌ها را نیز بیان می‌کند و این پدیده پیشتر توسط (McKersie & Bowley, 1993) گزارش شده است. تنوع کروموزومی به‌ویژه در همتاهای ۱، ۲ ،۳ و۴ نمایانگر تنوع ژنتیکی در جمعیت‌ها نیز به شمار می‌آید بنابراین تهیهٔ نقشهٔ ژنتیکی این جمعیت‌ها و استفاده از آن اطلاعات در اصلاح نباتات امکان‌پذیر است.

جمعیت‌های یونجه (*Medicago sativa* L.) مورد بررسی در کاریوتیپ خودشان دارای دو تیپ کروموزوم متاسانتریک (m) و ساب متاسانتریک (m) بودند و فراوانی متاسانتریک‌ها بیشتر بود و بنابراین جمعیت‌ها با این ویژگی به سه گروه کلاس‌بندی شده است؛ ۱. جمعیت‌هایی که در کاریوتیپ آن‌ها بیست عدد کروموزوم متاسانتریک (m) وجود دارد (تنها جمعیت Yeşilova-3)، ۲. جمعیت‌هایی که در کاریوتیپ آن‌ها ۲۴ کروموزوم متاسانتریک (m) وجود دارد (Bucak-2، Çay-2، Beyşehir-1 و CV. Maragheh). ۳. جمعیت‌هایی که در کاریوتیپ آن‌ها ۲۸ کروموزوم متاسانتریک (m) وجود دارد (Eğirdir-2، Ş. Karaağaç-2، Yalvaç-3، Senirkent-2، Sultandağı-1 و Bolvadin-3) (جدول ۲). درنهایت در این تحقیق، شناسنامهٔ کروموزومی اختصاصی برای یازده جمعیت از ذخایر توارثی یونجه (*Medicago sativa* L.) ایجادشده و این تحقیق نخستین کار ژنتیک یاخته‌ایی روی یونجه‌های بومی کشور ترکیه است.

سپاسگزاری

این تحقیق قسمتی از پروژهٔ تحقیقاتی TUBİTAK (شورای پژوهش‌های علمی و تکنولوژیکی ترکیه) به شمارهٔ ۱۱۰۲۵۷ و رسالهٔ دکترای دانشگاه آنکارا، ترکیه به شمارهٔ ۱۰۰۱۸۷۷۷ است که بدین‌وسیله از مسئولان مربوطه قدردانی می‌شود.

REFERENCES

1. Agarwal, K. & Gupta, P. K. (1983). Cytological studies in the genus *Medicago* linn. *Cytologia*, *48*(4), 781–

793.
2. Agayev, Y. M. (2002). New Features in Karyotype Structure and Origin of Saffron, *Crocus sativus* L. *CYTOLOGIA*, *67*(3), 245–252.
3. Agayev, Y. M., Zarifi, E. & Fernández, J. A. (2010). A study of karyotypes in the *Crocus sativus* L. Aggregate and origin of cultivated saffron. *Acta Horticulturae*, *850*(850), 47–54.
4. Bauchan, G. (2009). alfalfa (*Medicago sativa* ssp.*sativa* (L.) L. & L.). In *Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement:* (pp. 11–39). CRC Press.
5. Bauchan, G. R. & Campbell, T. A. (1994). Use of an image analysis system to karyotype diploid alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Journal of Heredity*, *85*(1), 18–22.
6. Bauchan, G. R., Campbell, T. A. & Hossain, M. A. (2002). Chromosomal Polymorphism as Detected by C-Banding Patterns in Chilean Alfalfa Germplasm. *Crop Science*, *42*(4), 1291.
7. Bauchan, G. R., Campbell, T. A. & Hossain, M. A. (2003). Comparative Chromosome Banding Studies of Nondormant Alfalfa Germplasm. *Crop Science*, *43*(6), 2037–2042.
8. Bauchan, G. R. & Hossain, M. A. (1997). Identification of Alfalfa Chromosomes Using Giemsa Banding and Image Analysis Techniques. In *Conventional and Novel Methodologies for Plant Improvement* (pp. 61–62).
9. Bauchan, G. R. & Hossain, M. A. (1998a). Brief communication. Karyotypic analysis of N-banded chromosomes of diploid alfalfa: *Medicago sativa* ssp. *Caerulea* and ssp. *falcata* and their hybrid. *Journal of Heredity*, *89*(2), 191–193.
10. Bauchan, G. R. & Hossain, M. A. (1998b). Cytogenetic studies of the nine germplasm sources of alfalfa. In *Proc. North Am. Alfalfa Improvement Conf., 36th, Bozeman, MT* (pp. 2–6).
11. Bauchan, G. R. & Hossain, M. A. (1999a). Constitutive heterochromatin DNA polymorphisms in diploid *Medicago sativa* ssp. falcata. *Genome*, *42*(5), 930–935.
12. Bauchan, G. R. & Hossain, M. A. (1999b). Detection of chromosome variations in *Medicago sativa*. In *Eucarpia Medicago Symposium Proceedings*.
13. Bauchan, G. R. & Hossain, M. A. (2001a). A computerized image analysis system to characterize small plant chromosomes. *Microscopy and Analysis*, 9–12.
14. Bauchan, G. R. & Hossain, M. A. (2001b). Distribution and characterization of heterochromatic DNA in the tetraploid African population alfalfa genome. *Crop Science*, *41*(6), 1921–1926.
15. Bingham, E. T. (1968). Transfer of Diploid *Medicago* spp. Germplasm to Tetraploid *M.sativa* L. in 4x-2x Crosses. *Crop Science*, *8*(6), 760–762.
16. Bingham, E. T., & McCoy, T. J. (1988). Cytology and Cytogenetics of Alfalfa. In *Alfalfa and Alfalfa Improvement* (pp. 737–776).
17. Bingham, E. T. & Saunders, J. W. (1974). Chromosome Manipulations in Alfalfa: Scaling the Cultivated Tetraploid to Seven Ploidy Levels1. *Crop Science*, *14*(3), 474–477.
18. Brummer, E. C., Cazcarro, P. M. & Luth, D. (1999). Ploidy determination of alfalfa germplasm accessions using flow cytometry. *Crop Science*, *39*(4), 1202–1207.
19. Camacho, J. P. M., Sharbel, T. F. & Beukeboom, L. W. (2000). B-chromosome evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *355*(1394), 163–178.
20. Falistocco, E., Falcinelli, M. & Veronesi, F. (1995). Karyotype and C-banding pattern of mitotic chromosomes in alfalfa, *Medicago sativa* L. *Plant Breeding*, *114*(5), 451–453.
21. Frame, J., Charlton, J. F. L. & Laidlaw, A. S. (1998). *Temperate forage legumes.* Wallingford: CAB INTERNATIONAL.
22. Gillies, C. B. (1970). Alfalfa Chromosomes. I. Pachytene Karyotype of a Diploid *Medicago falcata* L. and Its Relationship to M.*sativa* L.1. *Crop Science*, *10*(2), 169–171.
23. Gillies, C. B. (2009). Pachytene chromosomes of perennial Medicago species. *Hereditas*, *72*(2), 277–288.
24. Güleç, T. E. (2010). Bitkilerde Markör Destekli Seleksiyon. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, *3*(2), 67–79.
25. Hanson, A. A., Barnes, D. K., Hill, R. R. & Bauchan, G. R. (1988). The Genus and the Origin of the Comp. In *Alfalfa and alfalfa improvement* (pp. 93–124).
26. Havananda, T., Brummer, E. C. & Doyle, J. J. (2011). Complex patterns of autopolyploid evolution in alfalfa and allies (*Medicago sativa*; Leguminosae). *American Journal of Botany*, *98*(10), 1633–1646.
27. Havananda, T., Brummer, E. C., Maureira-Butler, I. J. & Doyle, J. J. (2010). Relationships among Diploid Members of the *Medicago sativa* (Fabaceae) Species Complex Based on Chloroplast and Mitochondrial DNA Sequences. *Systematic Botany*, *35*(1), 140–150.
28. Hossain, M. A. & Bauchan, G. R. (1999). Brief communication. Identification of B chromosomes using Giemsa banding in *Medicago*. *Journal of Heredity*, *90*(3), 428–429.
29. Huziwara, Y. (1962). Karyotype Analysis in Some Genera of Compositae. VIII. Further Studies on the Chromosomes of Aster. *American Journal of Botany*, *49*(2), 116.
30. Katepa-Mupondwa, F. M., Christie, B. R. & Michaels, T. E. (2002). An improved breeding strategy for autotetraploid Alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Euphytica*, *123*(1), 139–146.

31. Kingston-Smith, A. H., Marshall, A. H. & Moorby, J. M. (2012). Breeding for genetic improvement of forage plants in relation to increasing animal production with reduced environmental footprint. *Animal*, *7*(s1), 1–10.
32. Lavania, U. C. & Srivastava, S. (1992). A simple parameter of dispersion index that serves as an adjunct to karyotype asymmetry. *Journal of Biosciences*, *17*(2), 179–182.
33. Lavania, U. C. & Srivastava, S. (1999). Quantitative delineation of karyotype variation in *Papaver* as a measure of phylogenetic differentiation and origin. *Current Science*, *77*(3), 429–435.
34. Lesins, K. A. & Lesins, I. (1979). *Genus Medicago (Leguminosae). A taxogenetic study. Dr. W. Junk Publishers, The Hague*. Dordrecht: Springer Netherlands.
35. Lesins, K. & Gillies, C. B. (1972). Taxonomy and Cytogenetics of *Medicago*. In *Alfalfa Science and Technology* (Vol. agronomymo, pp. 53–86). American Society of Agronomy.
36. LEVAN, A., FREDGA, K. & SANDBERG, A. A. (1964). Nomenclature for Centromeric Position on Chromosomes. *Hereditas*, *52*(2), 201–220.
37. Masoud, S. A., Gill, B. S. & Johnson, L. B. (1991). C-Banding of Alfalfa Chromosomes: Standard Karyotype and Analysis of a Somaclonal Variant. *Journal of Heredity*, *82*(4), 335–338.
38. McCoy, T. J. & Bingham, E. T. (1988). Cytology and Cytogenetics of Alfalfa. In *Alfalfa and Alfalfa Improvement* (pp. 737–776).
39. McCoy, T. J. & Bingham, E. T. (1991). Alfalfa cytogenetics. *Chromosome Engineering in Plants: Genetics, Breeding, Evolution. Part B. Edited by T. Tsuchiya and PK Gupta. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands*, 399–418.
40. McKersie, B. D. & Bowley, S. R. (1993). Synthetic seeds of alfalfa. *Synseeds: Applications of Synthetic Seeds to Crop Improvement*, 231–255.
41. Michaud, R., Lehman, W. F. & Rumbaugh, M. D. (1988). World distribution and historical development. *Alfalfa and Alfalfa Improvement*, *29*(29), 25–56.
42. Mujeeb-Kazi, A., Roldan, S., Suh, D. Y., Sitch, L. A. & Farooq, S. (1987). Production and cytogenetic analysis of hybrids between Triticum aestivum and some caespitose Agropyron species. *Genome*, *29*(4), 537–553.
43. Pfeiffer, T. W. & Bingham, E. T. (1983). Abnormal meiosis in alfalfa, *Medicago sativa* : cytology of 2 N egg and 4 N pollen formation. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, *25*(2), 107–112.
44. Poehlman, J. M. (1987). *Breeding Field Crops*. Dordrecht: Springer Netherlands.
45. Quiros, C. F. & Bauchan, G. R. (1988). The genus Medicago and the origin of the *Medicago sativa* complex. *Alfalfa and Alfalfa Improvement*, *29*, 93–124.
46. Quiros, C. F. & Morgan, K. (1981). Peroxidase and leucine-aminopeptidase in diploidMedicago species closely related to alfalfa: Multiple gene loci, multiple allelism, and linkage. *Theoretical and Applied Genetics*, *60*(4), 221–228.
47. Reeves, A. (2001). MicroMeasure: A new computer program for the collection and analysis of cytogenetic data. *Genome*, *44*(3), 439–443.
48. Rieger, R., Michaelis, A. & Green, M. M. (1991). *Glossary of Genetics*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
49. Romero Zarco, C. (1986). A new nethod for estimating karyotype asymmetry. *Taxon*, *35*(3), 526–530.
50. Russelle, M. (2001). Alfalfa After an 8,000-year journey, the “Queen of Forages” stands poised to enjoy renewed popularity. *American Scientist*, *89*(3), 252–261.
51. Şakiroğlu, M., Doyle, J. J. & Brummer, E. C. (2010). Inferring population structure and genetic diversity of broad range of wild diploid alfalfa (*Medicago sativa* L.) accessions using SSR markers. *Theoretical and Applied Genetics*, *121*(3), 403–415.
52. Schlarbaum, S. E., Johnson, L. B. & Stuteville, D. L. (1988). Characterization of somatic chromosome morphology in alfalfa, *Medicago sativa* L.: Comparison of donor plant with regenerated protoclone. *CYTOLOGIA*, *53*(3), 499–507.
53. Small, E. & Bauchan, G. R. (1984). Chromosome numbers of the *Medicago sativa* complex in Turkey. *Canadian Journal of Botany*, *62*(4), 749–752.
54. Small, E. & Jomphe, M. (1989). A synopsis of the genus *Medicago* (Leguminosae). *Canadian Journal of Botany*, *67*(11), 3260–3294.
55. Stebbins, G. L. (1971). *Chromosomal evolution in higher plants*. London: Edward Arnold Ltd.,.
56. Tuğay, E. (1997). *Genel Bitki ıslahı*. GOP Üniv. Ziraat Fak. Tokat, Turkey.
57. Veronesi, F., Brummer, E. C., & Huyghe, C. (2010). Alfalfa. In B. Boller, U. K. Posselt, & F. Veronesi (Eds.), *Fodder Crops and Amenity Grasses* (pp. 395–437). New York, NY: Springer New York.
58. Watanabe, K., Yahara, T., Denda, T. & Kosuge, K. (1999). Chromosomal Evolution in the Genus *Brachyscome* (Asteraceae, Astereae): Statistical Tests Regarding Correlation Between Changes in Karyotype and Habit Using Phylogenetic Information. *Journal of Plant Research*, *112*(2), 145–161.
59. Yu, F., Lei, Y., Li, Y., Dou, Q., Wang, H. & Chen, Z. (2013). Cloning and characterization of chromosomal markers in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, *126*(7), 1885–1896.

60. Zarifi, E., Agayev, Y. ., Ganavati, F. & Aminizadeh, Z. (2005). Cytogenetics and evolution of Karyotype in wormwood, *Artemisia vulgaris* L. *Seed and Plant, Journal of Agricultural Research*, *22*(1), 1–12.
61. Zarifi, E. & Güloğlu, D. (2016). An improved Aceto-Iron-Haematoxylin staining for mitotic chromosomes in Cornelian cherry (*Cornus mas* L.). *Caryologia*, *7114*(January), 1–6.