"نهال و بذر"
جلد ۲۱، شماره ٤، سال ۱۳۸٤

بررسی تنوع ژنتیکی یونجه‌های یکساله با توجه به مطالعات کاریوتیپی
Karyological Study on Genetic Variation in Annual Alfalfa

احمدموسی پورگرجی، مسعود شیدائی، پریچهر احمدیان‌تهرانی و حسین میرزایی‌ندوشن

دانشکده علوم دانشگاه شهید بهشتی

تاریخ دریافت: ۱۳۸۳/۲/٦

چکیده

موسی پورگرجی، ا.، شیدائی، م.، احمدیان تهرانی، پ.، و میرزائی ندوشن، ح. ۱۳۸٤. بررسی تنوع ژنتیکی یونجه‌های یکساله با توجه به مطالعات کاریوتیپی. **نهال و بذر** ۲۱: ٦۱٦-٦۰۱.

گونه‌های یونجه‌های یک ساله از لگوم‌های علوفه‌ای مهم در منطقه غرب کشور می‌باشند ولی گزارش‌های کاریوتیپی درباره این گونه‌ها بسیار محدود می‌باشد. به منظور بررسی ژرم پلاسم این گونه‌ها که در بانک ژن گیاهان مرتعی موجود می‌باشند مطالعات کاریوتیپی انجام شد. در بررسی‌های انجام شده جزئیات کاریوتیپی اعم از طول کل کروموزوم، طول بازوی بزرگ، طول بازوی کوچک و نسبت بازوی بزرگ به بازوی کوچک اندازه‌گیری و ایدیوگرام آن رسم گردید. در بررسی‌های کاریوتیپی تنها گونه *Medicago rigidula* دارای 2n = 2x =14 کروموزوم بود و گونه‌های (*M. minima* 316، *M. polymorpha* 612، *M. orbicularis* 449، *M. radiata* 29، *M. radiata* 588، *M. trancatulla* 1146، *tiralis* 1038 و *M. polymorpha* 1123) همگی دارای 2n=2x = 16 کروموزوم بودند. در میان جمعیت‌هایی که دارای 2n = 2x =14 کروموزوم بودند گونه *M. rigidula* 1126 *دارای بیشترین* طول کل کروموزوم و گونه *M. rigidula* 454 دارای کمترین طول کل کروموزوم بودند. گونه‌های *M. littoralis* 1038 و *M. minima* 316 که دارای 2x=16 کروموزوم می‌باشند به ترتیب دارای بیشترین و کمترین طول کل کروموزوم بودند. میانگین طول کل کروموزوم و میانگین طول کروموزوم در اکثر گونه‌های خارجی بیشتر از گونه‌ها و ارقام بومی ایرانی بود. گونه‌ها و ارقامی که دارای اندازه کاریوتیپی بزرگ‌تر بودند اندازه بذر آن‌ها نیز بزرگ‌تر بود. در بین گونه‌ها و ارقام مورد بررسی تنها در دو گونه *M. littoralis* و *M. polymorpha* کروموزوم‌های B مشاهده شد. ارقام ۱۱۲٦، ٦۰٦ و ۱۱۹۹ از گونه *M. rigidula* و ۱۱۲۳و ٦۱۲ از گونه *M. polymorpha* و رقم ۵۸۸ از گونه *M. radiata* دارای کروموزوم‌های ماهواره‌دار بودند. نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای نشان داد که ارقام و گونه‌هایی که دارای اندازه کاریوتیپی مشابه و از نظر میانگین طول کروموزوم اختلاف معنی‌داری ندارند، دارای پراکنش و سازگاری یکسان بوده در یک گروه در کنار هم قرارگرفتند در روش آماری تجزیه به عامل‌ها، کروموزوم‌های شماره ۵، ٦ و ۷ در جمعیت‌هایی که دارای 2x=14 کروموزوم بودند و کروموزوم‌های شماره ۲، ۵ و ۷ درگونه‌ها و ارقامی که دارای 2x=16 کروموزوم بودند بیشترین تغییرات ساختمانی را نشان دادند. به منظور تعیین میزان تقارن کاریوتیپی ارقام و گونه‌های مختلف، آماره‌های ضریب تغییرات (CV) و درصد کل فرم (T.F%) محاسبه شدند. نتایج حاصل از آماره ضریب تغییرات نشان داد گونه *M. polymorpha* 612 دارای بیشترین تغییرات بین کروموزومی و *M. rigidula* 1128 دارای کمترین تغییرات بین کروموزومی بودند. از نظر آماره TF، گونه *M. minima* 316 دارای متقارن‌ترین کاریوتیپ و رقم 1126 از گونه *M. rigidula* دارای نامتقارن‌ترین کاریوتیپ بودند.

واژه‌های کلیدی: یونجه، تنوع ژنتیکی، سیتوژنتیک، کروموزوم.

* قسمتی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول که به گروه اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج ارائه شده است.

مقدمه

گیاه یونجه (*Medicago* spp.) قدیمی‌ترین گیاهی است که تنها برای مصارف علوفه‌ای کشت می‌شده و به دلیل خصوصیات فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی و همچنین تنوع گونه‌ها، توده‌ها و ارقام زراعی آن در سراسر جهان کشت می‌شود. گونه‌های مختلف یونجه یکساله در مناطق وسیعی از ایران که شامل مناطق رویشی خزری در شمال، مدیترانه‌ای در فلات‌های مرکزی و غرب و خلیج و عمانی در جنوب و جنوب غرب و در مناطقی که بیش از ۲۰۰ میلی‌متر بارندگی در سال دارند پراکنده‌اند (سندگل و ملک پور، ۱۳۷۳).

استفاده از خصوصیات کاریولوژیکی به منظور طبقه‌بندی گیاهان و کمک به حل مسائل و مشکلات تاکسونومی کلاسیک مطرح و به تدریج به اهمیت آن پی برده شده است. وجود اختلاف در شکل و اندازه کروموزوم‌ها و نیز رفتار کروموزوم‌ها در مراحل تقسیم میوز به ویژه تشکیل کیاسما می‌تواند بیانگر وجود اختلافات‌ژنتیکی‌باشد. اکثرمطالعات‌کروموزومی محدود به تعیین تعداد کروموزوم بوده که در تأیید یک تاکسون و یا جداسازی یک تاکسون از تاکسون دیگر در یک گروه رده‌بندی، و به عنوان یک صفت ثابت و ویژه به کار می‌رفته است (Helser and Whitaker, 1948). مطالعات کاریوتیپی به منظور مقایسه اختلافات موجود بین افراد یک گروه و آشکار شدن سیر تکاملی تغییرات درکروموزوم‌های تشکیل‌دهنده ژنوم انجام می‌گیرد (Sheidai *et al*., 1996). اختلاف اندازه ژنوم داخل گونه‌ها یا خویشاوندان نزدیک آن‌ها می‌تواند بیانگر تفاوت‌های ژنتیکی باشد. مورفولوژی کروموزوم‌های افراد هر گونه ثابت است مگر این که نقص کروموزومی در فردی دیده شود. کاریوتیپ نیز مانند دیگر خصوصیات سیستماتیک قابل تغییر است ولی به طور کلی یک کاریوتیپ مخصوص می‌تواند مشخص‌کننده گونه و حتی جنس باشد (احمدیان تهرانی، ۱۳۷٦). از آن جایی که ژنوم افراد حاوی اطلاعات ژنتیکی است و نتیجه بیان ژن‌ها، بروز صفات فنوتیپی است، بنابراین تغییر در ساختمان و اندازه کروموزوم‌ها، صفات فنوتیپی متفاوتی را بروز می‌دهد. مطالعات کاریوتیپی در داخل جمعیت‌های یک گونه نیز حائز اهمیت می‌باشد، چرا که جمعیت‌های مختلف یک گونه هر یک سازش ژنومی خاص خود را با محیطی که در آن می‌رویند نشان می‌دهند (Sheidai *et al*., 1996). لازم به ذکر است که سازگاری مکانی به دو صورت انجام می‌گیرد:

۱- شکل‌پذیری فنوتیپی ۲- سازش‌های ژنومی. سازش‌های فنوتیپی نسبت به سازش‌های ژنومی آهسته‌تر انجام می‌گیرد در نتیجه یکی از اساسی‌ترین اقدامات در یک مطالعه ژنتیکی و اصلاحی، بررسی ساختار ژنومی گونه‌های وحشی و جمعیت‌های آن‌ها است. درشناخت تغییرات کروموزومی به ویژه در روند تکامل

گونه‌ها، مطالعه و بررسی تقارن کاریوتیپ بسیار مهم است. کاریوتیپ‌ها را براساس خصوصیات مورفولوژیکی کروموزوم‌ها به سه دسته تقسیم‌بندی نموده‌اند، کاریوتیپ‌های متقارن، نامتقارن و دوشکلی (هنرور، ۱۳۷۵). جهت مقایسه و تجزیه و تحلیل مشاهدات کاریوتیپی و دسته‌بندی آن‌ها روش‌های متفاوتی ارائه شده است. یکی از روش‌ها محاسبه درصد کل فرم (TF) می‌باشدکه عبارت است از نسبت مجموع طول کل بازوهای کوچک به مجموع طول کل کروموزوم‌ها ضرب درصد. هنگامی که درصد TF برابر ۵۰ شود بیانگر این است که سانترومرها در وسط کروموزوم‌ها قرار گرفته‌اند. از شاخص‌های مهم آماری دیگر که در بیان پراکنش مشاهدات اهمیت زیادی دارد کمیت ضریب تغییرات (CV) می‌باشد. این کمیت وضعیت تغییرات اندازه‌های کروموزوم در هر کاریوتیپ و وضعیت تقارن کاریوتیپ‌ها را نشان می‌دهد، به طوری که پایین بودن ضریب تغییرات بیانگر تفاوت‌های جزئی در اندازه کروموزوم‌های یک کاریوتیپ است (هنرور، ۱۳۷۵). اخیراً در بسیاری از تحقیقات سیتوژنتیکی به منظور شناسایی تفاوت‌های ژنومی در میان جمعیت‌های مختلف یک گونه و همچنین ارقام مختلف زراعی از روش‌های آماری چند متغییره استفاده شده است. علاوه بر این از روش‌های تجزیه خوشه‌ای و رسته‌بندی (Ordination) در تعیین دوری یا نزدیکی ژنوتیپ‌ها، و نیز برای شناسایی بخش‌های کروموزومی تغییر کرده در کاریوتیپ ژنوتیپ‌ها از روش آماری تجزیه به مؤلفه‌های اصلی استفاده شده است. شیدایی‌و همکاران درگونه‌ها و جمعیت‌های مختلف زیره توانستند قرابت‌های گونه‌ها و جمعیت‌ها را با استفاده از تجزیه خوشه‌ای نشان دهند (Sheidai *et al*., 1996). هدف از این تحقیق بررسی تنوع ژنتیکی در جمعیت‌ها و گونه‌های مختلف یونجه‌های یک ساله و مقایسه اختلافات موجود بین آن‌ها، تعیین قرابت بین جمعیت‌ها و گونه‌ها و کاربرد تمامی این موارد در اصلاح نبات (انتخاب والدین برای تلاقی بین گونه‌ای و بین رقم)، همچنین آشکار شدن سیر تکاملی تغییرات در کروموزوم‌ها و این که کدام یک از کروموزوم‌ها در فرایند گونه‌زایی بیشترین تغییرات را داشته‌اند می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه در آزمایشگاه سیتوژنتیک دانشگاه شهید بهشتی تهران بر روی هفت گونه و هشت شماره نمونه از یونجه‌های یکساله موجود در بانک ژن گیاهان مرتعی مؤسسه تحقیقات منابع طبیعی البرز شهرستان کرج انجام شد. گونه‌ها و شماره نمونه‌های مورد مطالعه از نظر محل جمع‌آوری در دو گروه داخلی و خارجی قرار دارند.

گروه شماره نمونه‌ها و گونه‌های داخلی عبارت بودند از:

گونه *Medicago rigidula* که خود شامل هفت شماره نمونه ۱۱۹۹، ۱۱۲۸، ۱۱۲۷، ٦۰٦، ٤٥٤، ۲۷۱ و ۱۱۲٦ بود. سه شماره نمونه اول (۱۱۹۹، ۱۱۲۸ و ۱۱۲۷) از مناطق غرب کشور و کردستان جمع‌آوری شده بودند و شماره نمونه ٦۰٦ رقم محلی شهرستان کرج بود. مناطق جمع‌آوری شماره نمونه‌های ۱۲٦، ۲۷۱ و ٤٥٤ به ترتیب تبریز، قزوین و کرمانشاه بود. گونه‌های *M. minima* 316، *M. polymorpha* 612، *M. orbicularis* 449، *M. radiata* 29 و *M. radiata* 588، به ترتیب از مرکز تحقیقات البرز، کرج، تبریز، کرج و کرج جمع‌آوری شده بودند و در بانک ژن گیاهان مرتعی مؤسسه تحقیقات منابع طبیعی البرز شهرستان کرج موجود می‌باشند.

گونه‌های خارجی عبارت بودند از: *M. littiralis* 1038، *M. trancatulla* 1146 و *M. polymorpha* 1123.

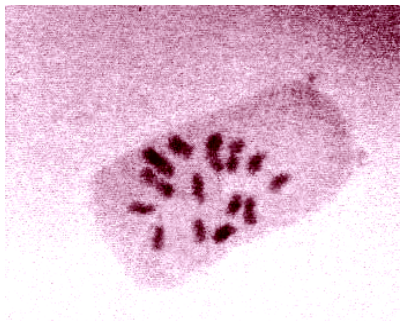
آزمایش به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی نامتعادل با سه تا ده تکرار انجام شد. فاکتورهای مورد بررسی کروموزوم و شماره نمونه‌ها بودند. از آن جایی که بین شماره نمونه‌های مورد بررسی از لحاظ تعداد کروموزوم پایه اختلاف وجود داشت (Heyn, 1965) گونه‌ها و شماره نمونه به دو گروه با تعداد کروموزوم مشابه تقسیم و تجزیه و تحلیل هر گروه به طور مجزا انجام شد.

به منظور بررسی کروموزوم‌های میتوزی از سلول‌های مریستمی ریشه استفاده شد. بدین صورت که بذرها ابتدا با محلول یک درصد هیپوکلرید سدیم به مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی و سپس با آب مقطر به طور کامل شستشو شدند. پس از ضدعفونی، بذرها جهت ریشه‌دار شدن در داخل تشتک‌های پتری حاوی کاغذ صافی مرطوب قرار داده شدند. جهت افزایش فراوانی سلول‌های متافازی از پیش تیمارهای (Pretreatment) مختلف از جمله کولشیسین، پارادی کلروبنزن، آلفا برومونفتالین و ۸- هیدروکسی کینولئین استفاده شد که تنها ۸- هیدروکسی کینولئین مناسب تشخیص داده شد. روش کار به این صورت بود که ریشه‌چه‌های به طول ۵ تا ۱۰ میلی‌متر در ساعت ۹ تا ۱۲ صبح جدا شده و در محلول ۰/۰۰۲ مولار ۸- هیدروکسی کینولئین به مدت دو ساعت در درجه حرارت اتاق قرار داده شدند و پس از آن به مدت پنج دقیقه با آب مقطر کاملاً شستشو و جهت حفظ و نگهداری اشکال سلول‌ها و محتویات آن‌ها و جلوگیری از تغییرات احتمالی آن‌ها به مدت ۲٤ ساعت در محلول تثبیت کننده فارمر (اسید استیک گلاسیال و اتانول خالص به نسبت یک به سه) قرار داده شدند. برای نگهداری طولانی مدت (٦ ماه) و مطالعه در فرصت‌های مناسب، ریشه‌ها را پس از خروج از محلول تثبیت‌کننده با آب مقطر کاملا شسته و آب اضافی را با کاغذ خشک‌کن گرفته و بلافاصله در الکل ۷۰ درصد قرار داده و در دمای ٤ تا ۵ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری شدند. برای تهیه نمونه،

ریشه‌ها پس از خروج از محلول الکل ۷۰ درصد و یا محلول تثبیت‌کننده و شستشو با آب مقطر درماده هیدرولیزکننده (اسید کلریدریک نرمال) به مدت پنج دقیقه و در دمای ٦٠ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. جهت مطالعه شکل کروموزوم‌ها با میکروسکوپ، نیاز به رنگ‌آمیزی نمونه‌ها بود، لذا ریشه‌ها را بعد از خروج از ماده هیدرولیزکننده با آب مقطر کاملاً شسته و با کاغذ خشک‌کن آبگیری شده و انتهای مریستمی آن جدا و یک قطره رنگ استو ارسئین دو درصد روی آن ریخته شد. بعد از آن، عمل له کردن صورت گرفت بدین صورت که با سوزن بافت را خرد کرده و یک لامل روی آن قرار داده و توسط شیئی مانند ته خودکار چند ضربه آهسته به طوری که لامل حرکت نکند روی لامل وارد گردید. با این عمل سلول‌ها از هم جدا شده و کاملاً در یک سطح قرار گرفتند. لام آماده شده روی چراغ الکلی با حرارت غیرمستقیم کمی گرم شد تا رنگ‌پذیری بهتر صورت گیرد. عمل اسکواش توسط فشار انگشت انجام شد و برای دائمی کردن نمونه‌ها از روش شیمیایی گام به گام (شافعی، ١٣٧٦) استفاده شد. نمونه‌های تهیه شده با عدسی‌های شیئی ۱۰، ۲۰ و ٤٠ میکروسکوپ بررسی و بهترین سلول متافازی انتخاب شدند. با میکروسکوپ دوربین‌دار از سلول‌های متافازی با عدسی شیئی ۱۰۰، عکس‌برداری شد و توسط آینه ترسیم کروموزوم‌ها با دقت روی صفحه کاغذ ترسیم شدند. تعداد کروموزوم‌ها، محل سانترومرها، طول کروموزوم، طول بازوهای کوچک و بزرگ، تعداد فرورفتگی‌های ثانویه و طول ماهواره (Satellite) اندازه‌گیری و ثبت شدند. در ضمن وجود یا عدم وجود کروموزوم‌های B نیز مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت داده‌ها با کمک نرم‌افزارهای آماری SAS و SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

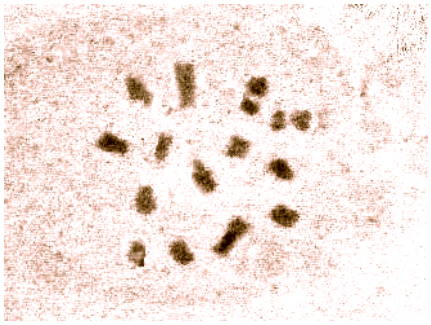
نتایج و بحث

در بررسی کاریوتیپی به عمل آمده مشاهده شد که گونه و شماره نمونه‌های *M.* rigidula دارای 2x=14 کروموزوم و سایر گونه‌ها و شماره نمونه‌های مورد بررسی دارای 2x=16 کروموزوم هستند (شکل‌های ۱ الی ۵). دامنه طول کروموزوم‌ها برای کلیه گونه‌ها و شماره نمونه‌های مورد بررسی کم‌تر از ۳ میکرون بود که با گفته‌های محققین دیگر (Heyn, 1965؛ Simon and Simon, 1965) مطابقت دارد. شماره نمونه‌های ١١٢٦، ٦٠٦ و ١١٩٩ از گونه *M. rigidula* و ۱۱۲۳ و ٦١٢ از گونه *M. polymorpha* و شماره نمونه ۵۸۸ از گونه *M. radiate* دارای کروموزوم‌های ماهواره‌دار بودند. طول ماهواره‌ها بین ۰/۲ و ۰/٥٦ میکرون بود و روی بازوی کوچک کروموزوم قرار داشتند. میانگین طول بلندترین کروموزوم‌ها برای تمامی شماره نمونه‌ها و گونه‌ها ٤/٠٦ میکرون و میانگین طول کوتاه‌ترین کروموزوم‌ها برای آن‌ها ۲/۰۹ میکرون بود. طول کل



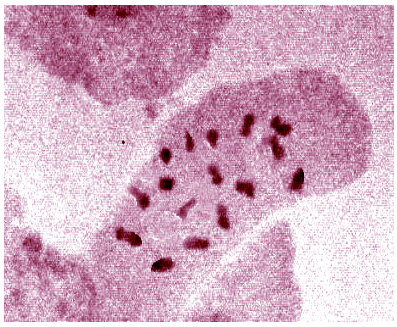
شکل۱- کروموزوم‌های متافازی گونه *M. rigidula*1126

Fig. 3. Metaphas chromosomes in *M. rigidula* 1126



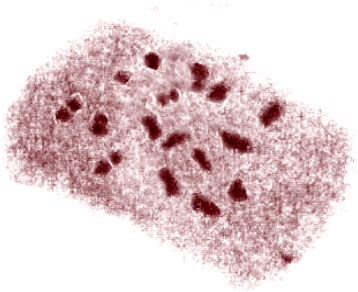
شکل ۲ – کروموزوم‌های متافازی گونه *M. rigidula*1127

Fig. 4. Metaphas chromosomes in *M. rigidula* 1127



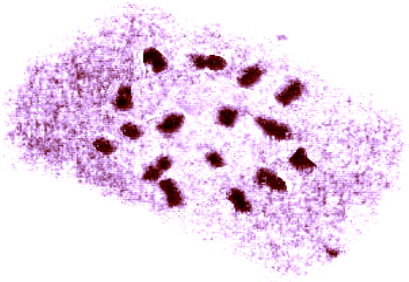
شکل ۳- کروموزوم‌های متافازی گونه *M. transcattula*1146

Fig. 5. Metaphas chromosomes in *M. transcattula* 1146



شکل ۴- کروموزوم‌های متافازی گونه *M. orbicularis* 449

Fig. 6. Metaphas chromosomes in *M. orbicularis* 449

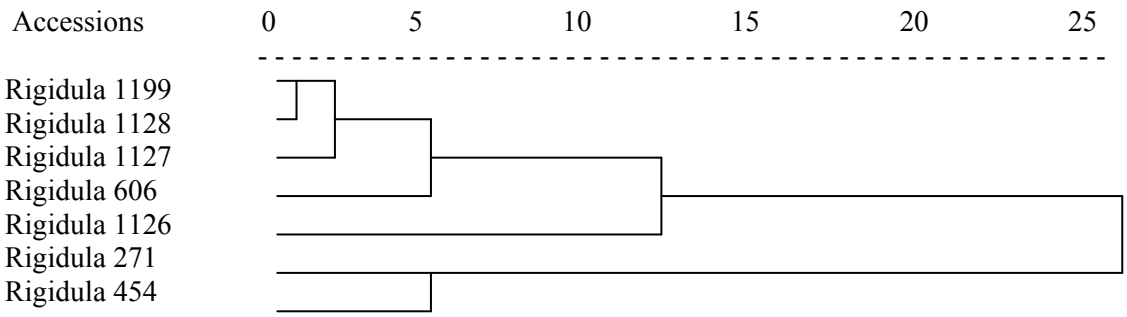


شکل ٥- کروموزوم‌های متافازی گونه *M. polymorpha* 612

Fig. 7. Metaphas chromosomes in *M. polymorpha* 612

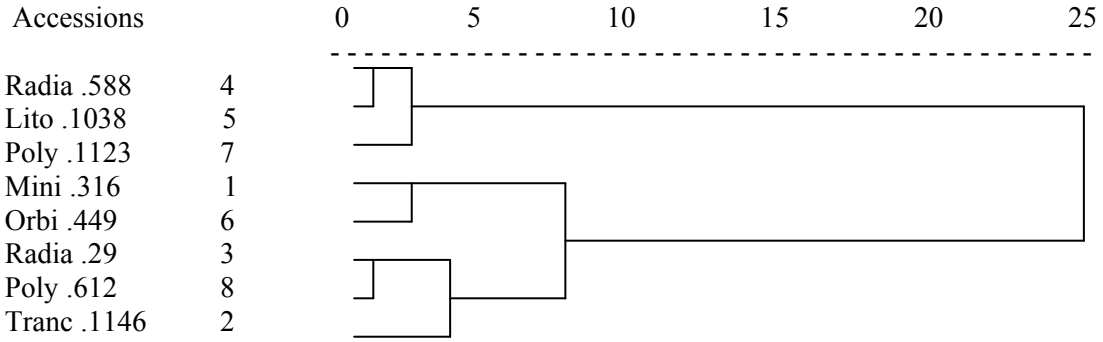
کروموزوم و میانگین طول کروموزوم در اکثر گونه‌های خارجی بیشتر از گونه‌ها و شماره نمونه‌های ایرانی بود. همچنین گونه و شماره نمونه‌هایی که دارای اندازه کاریوتیپ بزرگ‌تر بودند اندازه بذر آن‌ها نیز بزرگ‌تر بود. خلاصه نتایج مربوط به بررسی‌های کاریوتیپی در جدول ۱ آورده شده است. تجزیه واریانس (ANOVA) فاکتوریل با در نظرگیری دو فاکتور کروموزوم و شماره نمونه وجود اختلاف معنی‌دار بین شماره نمونه‌ها را نشان داد، ضمناً برای نشان دادن تفاوت در اندازه کروموزوم‌ها آزمون L.S.D صورت گرفت که نتایج آن در جدول‌های ۲ تا ۵ آورده شده است . نکته قابل توجه وجود اختلاف معنی‌دار بین برخی از جمعیت‌های گونه *M. radiata* و جمعیت‌های گونه *M. polymorpha* بود و بیانگر این واقعیت است که در تمایز این جمعیت‌ها از یکدیگر تغییر در مقدار کمی DNA نقش زیادی داشته است. نتایج حاصل از بررسی آماره ضریب همبستگی (جدول‌های ٦ و ٧) نشان داد ، شماره نمونه‌های مختلف گونه *M. rigidu*la از نظر طول بازوی بزرگ همبستگی بالا و معنی‌داری با همدیگر دارند (۰/۹٦-۰/۸۳). بیشترین همبستگی از نظر طول بازوی بزرگ بین شماره نمونه‌های ۱۱۲٦ و ٤٥٤ از گونه *M. rigidula* (۰/۹۸) و شماره نمونه‌های ۵۸۸ و ۲۹ از گونه *M. radiata* (۰/۹۸) بود. آماره ضریب همبستگی برای طول کل کروموزوم گونه‌ها و شماره نمونه‌هایی که دارای 2x = 14 کروموزوم می‌باشند نشان داد که شماره نمونه‌های ۲۷۱ با ۱۱۲۷ دارای کمترین تشابه (۰/۸٦) و شماره نمونه‌های ۱۱۲۸ و ۱۱۲٦ دارای بیشترین تشابه (۰/۹۹) می‌باشند همچنین استنباط می‌شود که شماره نمونه‌های مختلف گونه *M. rigidula* از نظر طول کل کروموزوم کاملا شبیه به هم می‌باشند که خود همگن بودن شماره نمونه‌ها را از نظر طول کل کروموزوم و قرار گرفتن آن‌ها در داخل یک گونه را تأیید می‌کند. در گونه‌ها و شماره نمونه‌هایی که دارای 2x=16 کروموزوم می‌باشند شماره نمونه ٦١٢ از گونه *M. polymorpha* با شماره نمونه ٤٤٩ از گونه *M. orbicularis* دارای کمترین تشابه (۰/۸٦) و شماره نمونه‌های ۱۱۲۳ و ۲۹ بیشترین تشابه (۰/۹۹) را داشتند. از نظر طول بازوهای کوچک شماره نمونه‌های ٤٥٤ با ۱۱۲۷ (۰/٦۲) و ۱۰۳۸ با ۳۱٦ (۰/٤٦) کمترین تشابه و ۱۱۲۷ با ٦۰٦ (۰/۹۵) و ٦۱۲ با ۵۸۸ (۰/۹٦) بیشترین تشابه را نشان دادند. ضرایب همبستگی کارل پیرسون برای نسبت بازوی L به S (L/S) کمتر از سه صفت فوق الذکر بود و میزان آن از ۰/۸٤۷٤ تا ۰/۷۰۷٦- برای گونه‌ها و شماره نمونه‌هایی که دارای 2x=14 کروموزوم و ۰/٤۹٤۲- تا ۰/۷۷۲۵ برای گونه‌ها و شماره نمونه‌هایی که دارای 2x=16 کروموزوم بودند متغییر بود. مقدار ضریب همبستگی منفی نشان‌دهنده تغییرات ساختمانی در روند تکامل و گونه‌زایی می‌باشد. لازم به ذکر است گونه‌ها و شماره نمونه‌های مورد بررسی از نظر طول کل

کروموزوم همگن‌تر از طول بازوی بزرگ و آن نیز همگن‌تر از طول بازوی کوچک بودند و از نظر نسبت بازوی L به S کمترین یکنواختی را نشان می‌دادند. جهت دسته‌بندی شماره نمونه‌ها و گونه‌ها و تعیین دوری و نزدیکی آن‌ها براساس صفات کاریوتیپی (طول کل کروموزوم، طول بازوی بلند، طول بازوی کوچک و نسبت طول کروموزوم بلند به کروموزوم کوچک) تجزیه خوشه‌ای صورت گرفت. از روش تجزیه خوشه WARD به دلیل داشتن واریانس خطا کمتر و ضریب همبستگی بالا بین صفاتی که وارد مدل می‌شوند جهت دسته‌بندی استفاده شد، ضمناً روش UPGM نیز جهت دسته‌بندی مورد بررسی قرار گرفت ولیکن گروه‌بندی حاصل از روش WARD قابل قبول‌تر بود، لذا تنها به نتایج حاصل از روش WARD اشاره می‌گردد. نتایج حاصله در فاصله اقلیدسی ۱۰ برای شماره نمونه‌هایی که دارای 2x=14 کروموزوم بودند نشان داد، شماره نمونه‌هایی که از نظر میانگین طول کروموزوم با یکدیگر اختلاف نداشتند در یک گروه قرار گرفتند همچنین شماره نمونه‌هایی که محل جمع‌آوری یکسانی داشتند با هم در یک گروه و در کنار یکدیگر قرار گرفتند (شکل ٦). نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای در فاصله ۱۰ برای شماره نمونه‌ها و گونه‌هایی که دارای 2x=16 کروموزوم بودند نشان داد، شماره نمونه‌ها و گونه‌هایی که دارای اندازه کاریوتیپی مشابه بوده و از نظر میانگین طول کروموزوم اختلاف معنی‌داری ندارند در یک گروه و در کنار هم قرار گرفته‌اند. همچنین گونه‌های خارجی موردمطالعه درکنار هم و در یک گروه قرار گرفتند. نکته قابل توجه این می‌باشد که گونه‌های *M. polymorpha* و *M. littoralis* که جزء گونه‌های با فصل رشد کوتاه بوده و در نواحی خشک با خاک‌های شنی دیده می‌شوند و در آزمایشی در کشت پائیزه و بهاره از نظر ترتیب عملکرد در کنار هم قرار گرفتند (سندگل، ۱۳۷۰)، در این بررسی نیز در کنار هم واقع شدند. گونه‌های *M. polymorpha*، *M. orbicularis* و *M. minima* که جزء گونه‌هایی هستند که در خاک‌های شور رشد می‌نمایند (سندگل و ملک‌پور، ۱۳۷۱) در تجزیه خوشه‌ای نیز این سه گونه به دنبال هم قرار گرفتند. گونه‌های 29 *M. radiata*، 612 *M. polymorpha* و *M. trancutalla* که جزء گونه‌های خارجی هستند و در آزمایش‌های قبلی در فصل سرد عملکرد آن‌ها بالاتر از گونه‌های دیگر مورد تحقیق بوده و سازگار به کشت مختلط با هم و کشت مخلوط آن‌ها دارای عملکرد نسبتاً بالایی بوده است (سندگل، ۱۳۷۰؛ سندگل و ملک‌پور، ۱۳۷۱)، با هم در یک گروه قرار گرفتند (شکل ۷). با توجه به نتایج به دست آمده از تجزیه خوشه‌ای، تجزیه واریانس، آزمون LSD، پراکنش و سازگاری گونه‌ها و شماره نمونه‌ها و مقایسه این نتایج با تحقیقات انجام شده قبلی (سندگل، ۱۳۷۰؛ سندگل و ملک‌پور، ۱۳۷۱)، چنین



شکل ۶- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش ward برای شماره نمونه‌های یونجه یکساله ١٤ کروموزومی

Fig. 2. Cluster analysis dendrogram using ward method for *Medicago accessions* with 2x = 14



شکل ۷- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش ward برای شماره نمونه‌های یونجه یکساله ١٦ کروموزومی

Fig. 1. Cluster analysis dendrogram using ward method for *Medicago accessions* with 2x = 16

احتمال می‌رود که گونه‌ها و شماره نمونه‌هایی که دارای میانگین طول کروموزوم بالا می‌باشند برای کشت‌های بهاره و آن‌هایی که دارای میانگین طول کروموزوم متوسط هستند برای کشت‌های پاییزه مناسب باشند. همچنین نمونه‌هائی که دارای میانگین طول کروموزوم پایین می‌باشند برای کاشت در شرایط خاص (شور) مناسب می‌باشند. برای اطمینان بیشتر از گروه‌بندی‌ها (تجزیه خوشه‌ای) رسته‌بندی افراد براساس دو مؤلفه اول PCA برای گونه‌ها و

جدول ۱- مشخصات کاریوتیپی گونه‌ها و شماره نمونه‌های یونجه یکساله (اندازه‌ها برحسب میکرون)

Table 1. Karyotypic characteristics of different accessions of *Medicago species* (measurements in micron)

گونه و شماره نمونه SP & AC	طول‌کوتاه‌ترین کروموزوم SCL	طول‌بلندترین کروموزوم LCL	میانگین طول کل کروماتین TCLM	میانگین طول کرموزوم CLM	میانگین طول ماهواره SLM	ضریب تغییرات CV	مجموع کل فرم TF
M. rigidula 1126	2.68	4.83	50.56	3.61	0.50	20.17	37.85
M. rigidula 606	2.42	4.00	47.76	3.41	0.56	24.60	38.90
M. rigidula 1127	2.43	4.35	44.10	3.15		24.40	41.04
M. rigidula 271	1.70	3.25	36.56	2.61		20.60	43.56
M. rigidula 1199	2.17	3.89	39.72	2.84	0.48	20.42	42.43
M. rigidula 1128	2.32	3.97	42.26	3.02		18.50	39.56
M. rigidula 454	1.75	3.50	34.40	2.46		24.89	40.69
M. polymorpha 1123	2.46	4.58	55.68	3.84	0.44	20.10	41.63
M. polymorpha 612	1.48	4.12	43.74	2.73	0.20	30.00	39.14
M. minima 316	1.43	2.75	32.02	2.00		22.00	44.90
M. trancattula 1146	2.25	4.13	50.00	3.13		20.12	41.64
M. radiata 29	1.90	3.91	46.44	2.90		22.75	41.25
M. radiata 588	2.32	4.42	56.52	3.53	0.30	19.26	39.91
M. litoralis 1038	2.47	4.90	61.40	3.82		21.78	38.76
M. orbicularis 449	1.55	3.25	39.70	2.48		22.98	42.31

SP & AC: Species and accessions SCL: Shortest chromosome length LCL: Largest chromosome length
TCLM: Total chromatin length mean CLM: Chromosome length mean SLM : Satellite length mean
CV: Coefficent of variance TF : Total form

جدول ۲- تجزیه واریانس برای طول کروموزوم گونه‌ها و شماره نمونه‌های یونجه یکساله ۱۶ کروموزومی

Table 2. Analysis of variance for chromosome length in *Medicago accessions* with 2x=16

S. O. V.	منابع تغییرات	درجه آزادی df.	مجموع مربعات SS	میانگین مربعات MS	F
Total	کل	223	214.465	0.962	
Chromosome	کروموزوم	7	81.125	11.589	35.225**
Species/ accessions	گونه یا شماره نمونه	7	76.788	10.970	33.343**
Accession/ chromosome	شماره نمونه / کروموزوم	49	3.770	0.77	0.234^{ns}
Error	خطا	160	52.782		0.329

**: Significant at the 1 % level. **: معنی‌دار در سطح ۱ ٪.

ns: Non significant. ns: غیر معنی‌دار.

جدول ۳- مقایسه میانگین طول کروموزوم در گونه‌ها و شماره نمونه‌های یونجه یکساله ۱۶ کروموزومی

Table 3. Mean comparison of chromosome length in different accessions of *Medicago species* (2x =16)

گونه و شماره نمونه Species and accessions	میانگین طول کروموزوم Mean of chromosome length
M. minima 316	2.017 e
M. orbicularis 449	2.483 d
M. polymorpha 612	2.734 cd
M. radiate 29	2.896 cd
M. transcattula 1146	3.122 bc
M. polymorpha 1123	3.494 ab
M. radiate 588	3.541 ab
M. littoralis 1038	3.784 a

حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح % 1 می‌باشد.

Similar letter in each column indicates no significant diffference at the 1% level of probability.

جدول ٤- تجزیه واریانس برای طول کروموزوم نمونه‌های یونجه یکساله ۱٤ کروموزومی

Table 4. Analysis of variance for chromosome length in *Medicago accessions* with 2x=14

S. O. V.	منابع تغییرات	درجه آزادی df.	مجموع مربعات SS	میانگین مربعات MS	F
Total	کل	181	111.406	0.616	
Chromosome	کروموزوم	6	60.125	10.021	51.691**
Species/ accessions	گونه یا شماره نمونه	6	21.907	3.651	18.834**
Accession/ chromosome	شماره نمونه / کروموزوم	36	3.896	0.180	0.558^{ns}
Error	خطا	133	25.478	0.196	

**: Significant at the 1 % level.

**: معنی‌دار در سطح ۱ ٪.

ns: Non significant.

ns: غیر معنی‌دار.

جدول ۵- مقایسه میانگین طول کروموزوم گونه‌ها و شماره نمونه‌های یونجه یکساله ۱٤ کروموزومی

Table 5. Mean comparison of chromosome length in different accessions of *Medicago species* (2x =14)

گونه و شماره نمونه Species and accessions	میانگین طول کروموزوم Mean of chromosome length
M. rigidula 454	2.457 d
M. rigidula 271	2.527 d
M. rigidula 1199	2.854 cd
M. rigidula 1128	3.014 bc
M. rigidula 1127	3.125 bc
M. rigidula 606	3.266 ab
M. rigidula 1126	3.561 a

حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح 1% می‌باشد.

Similar letter in each column indicate no significant diffference at the 1% level of probability.

جدول ۶- نتایج تجزیه به عامل‌ها برای نمونه‌های یونجه یکساله ۱٦ کروموزومی

Table 6. Factor analysis results for *Medicago accessions* with 2x = 16

		Factors loading ضرایب عاملی			
Trait	صفت	1	2	3	4
TL 1	طول کل ۱	.9475*	.0694	.1190	-.0175
LL 1	طول بازوی بزرگ ۱	.9509*	-.1942	.1817	-.0035
LS 1	طول بازوی کوچک ۱	.8111	.3831	-.3455	.1865
L/S 1	نسبت بازوی بزرگ به بازوی کوچک ۱	.4809	-.4665	.5628	-.1593
TL 2	طول کل ۲	.9944*	-.0772	.0502	.0109
LL 2	طول بازوی بزرگ ۲	.9653*	.0324	.2394	.0852
LS 2	طول بازوی کوچک ۲	.8621	-.2817	-.3374	-.1396
L/S 2	نسبت بازوی بزرگ به بازوی کوچک ۲	.4540	.4379	.7105	.2142
TL 3	طول کل ۳	.9924*	-.0261	.0399	-.0445
LL 3	طول بازوی بزرگ ۳	.9186*	.0650	-.0691	-.3351
LS 3	طول بازوی کوچک ۳	.9164*	-.1649	.1294	.3226
L/S 3	نسبت بازوی بزرگ به بازوی کوچک ۳	.8736	-.0694	.2726	.0652
TL 4	طول کل ٤	-.1286	.4691	.7672	.1515
LL 4	طول بازوی بزرگ ٤	.9892*	-.0035	-.0857	-.0693
LS 4	طول بازوی کوچک ٤	.9715*	-.1784	-.1166	.0414
L/S 4	نسبت بازوی بزرگ به بازوی کوچک ٤	.8937	.2898	-.0230	-.2461
TL 5	طول کل ٥	.3976	-.6771	-.2297	.4104
LL 5	طول بازوی بزرگ ٥	.9891*	.0877	-.0221	.0975
LS 5	طول بازوی کوچک ٥	.9397*	.2395	-.0980	.2168
L/S 5	نسبت بازوی بزرگ به بازوی کوچک ٥	.9319*	-.1916	.0229	-.2468
TL 6	طول کل ٦	.3088	.6443	-.2290	.5977
LL 6	طول بازوی بزرگ ٦	.9368*	.1990	-.1986	-.1106
LS 6	طول بازوی کوچک ٦	.5831	.4910	-.4740	-.2841
L/S 6	نسبت بازوی بزرگ به بازوی کوچک ٦	.9444*	.0185	-.2533	.0304
TL 7	طول کل ۷	.7738	.4516	-.0803	-.3155
LL 7	طول بازوی بزرگ ۷	.4257	-.5276	-.2823	.4478
LS 7	طول بازوی کوچک ۷	.8960	-.2418	.2242	.1124
L/S 7	نسبت بازوی بزرگ به بازوی کوچک ۷	.9907*	.0093	.0717	.0379
TL 8	طول کل ۸	.9547*	.1360	.0199	.1356
LL 8	طول بازوی بزرگ ۸	.9742*	-.1137	.1181	-.0586
LS 8	طول بازوی کوچک ۸	-.6617	.3327	-.1990	.3944
L/S 8	نسبت بازوی بزرگ به بازوی کوچک ۸	.9914*	.0088	-.0033	.0693

TL: Total length LL: Large arm length LS: Short arm length L/S: Ratio large arm to short arm

اعداد ۱، ۲، ۳، ٤، ٥، ٦، ۷ و ۸ در ستون صفات: کروموزوم‌های شماره یک، دو، سه، چهار، پنج، شش، هفت و هشت.

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 8 in first column: Chromosom number 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 8, respectively.

*: Significant factors loading. * : ضرایب عاملی معنی‌دار.

جدول ۷- نتایج تجزیه به عامل‌ها برای نمونه‌های یونجه‌های یکساله ١٤ کروموزومی

Table 7. Factor analysis results for *Medicago accessions* with 2x = 14

		Factors loading ضرایب عاملی				
Trait	صفت	1	2	3	4	5
TL 1	طول کل ۱	.9059*	-.1108	.3642	-.0071	-.1757
LL 1	طول بازوی بزرگ ۱	.9339*	-.2107	-.1144	.0409	-.1198
LS 1	طول بازوی کوچک ۱	.8534	.2149	-.1730	-.0838	.1235
L/S 1	نسبت بازوی بزرگ به بازوی کوچک ۱	-.2046	.2671	-.4654	.7737	.2598
TL 2	طول کل ۲	.9428*	.0334	-.1809	-.2735	-.0454
LL 2	طول بازوی بزرگ ۲	.9569*	-.0599	.0260	-.2667	.0932
LS 2	طول بازوی کوچک ۲	.5573	.2642	-.6525	-.1899	-.3894
L/S 2	نسبت بازوی بزرگ به بازوی کوچک ۲	.7754	-.1706	.3227	-.1090	.5014
TL 3	طول کل ۳	.9750*	-.1202	-.0332	-.1493	-.0711
LL 3	طول بازوی بزرگ ۳	.9752*	.0203	-.1338	-.1719	.0082
LS 3	طول بازوی کوچک ۳	.7578	-.4053	.2177	-.4204	-.1631
L/S 3	نسبت بازوی بزرگ به بازوی کوچک ۳	.8063	.4133	.3399	.2459	.0121
TL 4	طول کل ٤	.8452	.3184	-.3806	.1028	.1632
LL 4	طول بازوی بزرگ ٤	.9908*	-.1056	.0106	-.0566	.0513
LS 4	طول بازوی کوچک ٤	.9562*	-.1483	-.0729	-.1147	.1626
L/S 4	نسبت بازوی بزرگ به بازوی کوچک ٤	.9475*	-.0169	.2611	.1197	-.1143
TL 5	طول کل ٥	.6821	-.2783	-.4923	-.3003	.3483
LL 5	طول بازوی بزرگ ٥	.9531*	.0277	.1767	.2177	.1092
LS 5	طول بازوی کوچک ٥	.9472*	.2301	.1374	.1639	.0498
L/S 5	نسبت بازوی بزرگ به بازوی کوچک ٥	.7375	-.4893	.2330	.3008	.2324
TL 6	طول کل ٦	.7448	.6443	.0107	-.0089	-.0980
LL 6	طول بازوی بزرگ ٦	.8590	.0251	-.3718	.3418	-.0259
LS 6	طول بازوی کوچک ٦	.1073	.5185	.8397	-.0324	.0399
L/S 6	نسبت بازوی بزرگ به بازوی کوچک ٦	.8948	.0150	.0729	.3051	-.2685
TL 7	طول کل ۷	.8200	.5189	.0435	.1153	-.1135
LL 7	طول بازوی بزرگ ۷	.5944	-.5858	.1323	.4403	-.2666
LS 7	طول بازوی کوچک ۷	-.0431	.8942	.0309	-.3012	.1059
L/S 7	نسبت بازوی بزرگ به بازوی کوچک ۷	.9865*	-.0599	-.1482	-.0051	-.0335

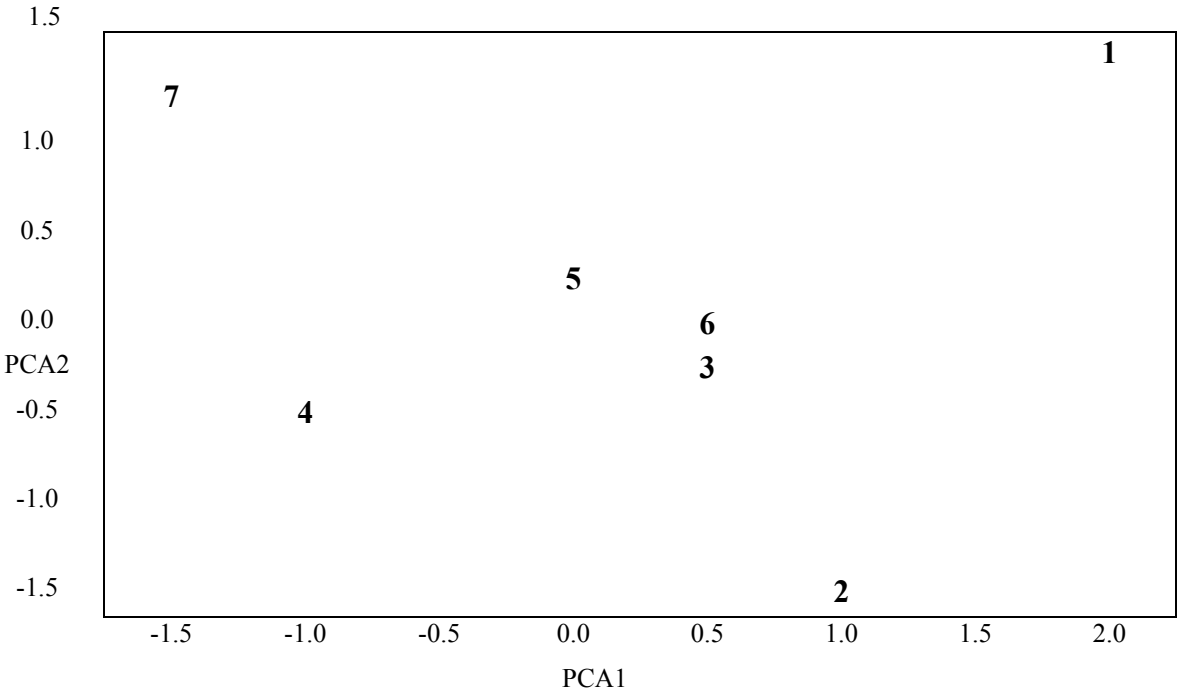
TL: Total length LL: Large arm length LS: Short arm length L/S: Ratio large arm to short arm

اعداد ۱، ۲، ۳، ٤، ٥، ٦ و ۷ در ستون صفات: کروموزوم‌های شماره یک، دو، سه، چهار، پنج، شش و هفت.

1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 in first column: Chromosom number 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7, respectively.

*: Significant factors loading. * : ضرایب عاملی معنی‌دار.

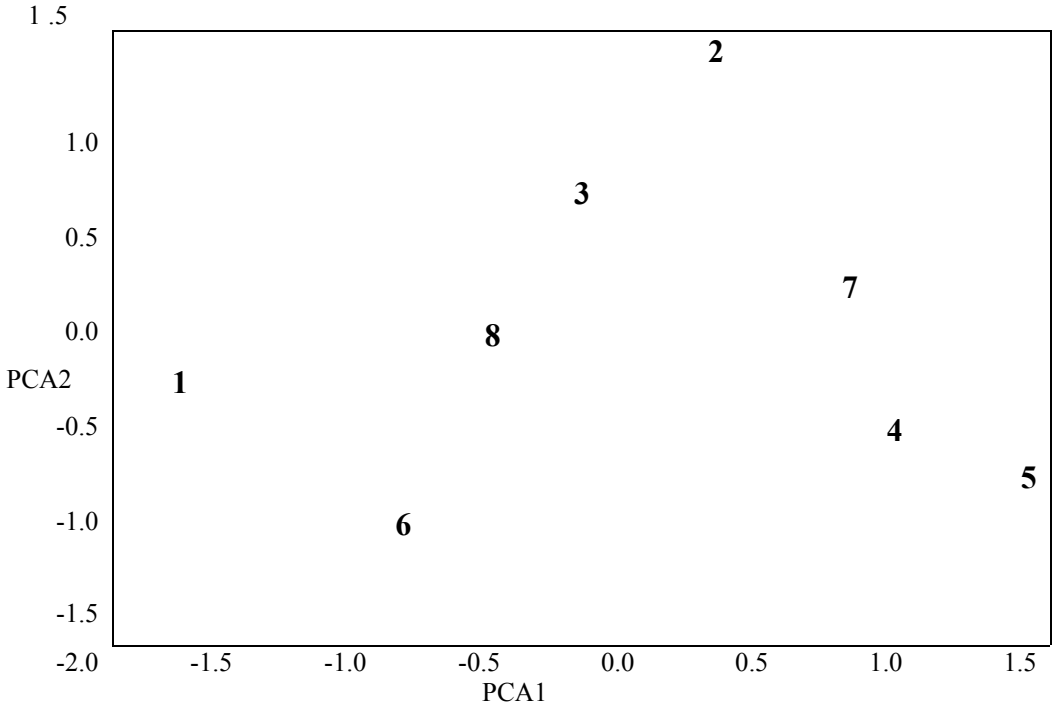
شماره نمونه‌هایی که دارای 2x=14 و 2x=16 کروموزوم بودند به طور مجزا صورت گرفت که نتایج حاصل از آن به طور کامل نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای را تأیید نمود (شکل‌های ۸ و ۹). نتایج حاصل از تجزیه به عامل‌ها که به منظور تعیین متنوع‌ترین صفات کاریوتیپی برای شماره نمونه‌هایی که دارای 2x=14 کروموزوم بودند نشان داد طول کل کروموزوم‌های ۱، ۳، ٤، ٥، ٦ و ۷، طول بازوی بزرگ کروموزوم‌های ۳، ٤، ٥، ٦ و ۷، طول



شکل ۸- دیاگرام حاصل از رسته‌بندی برای شماره نمونه‌های یونجه‌های یکساله ١٤ کروموزومی

Fig. 8. Ordination diagram for *Medicago accessions* with 2x = 14

1: *M. rigidula* 1126 2: *M. rigidula* 606 3: *M. rigidula* 1127 4: *M. rigidula* 271
5: *M. rigidula* 1199 6: *M. rigidula* 1128 7: *M. rigidula* 454



شکل ۹- دیاگرام حاصل از رسته‌بندی برای شماره نمونه‌های یونجه‌های یکساله

Fig. 9. Ordination diagram for *Medicago accessions* with 2x = 16

1: *M. minima* 316 2: *M. trancattula* 1146 3: *M. radiata* 29 4: *M. radiata* 588
5: *M. littoralis* 1038 6: *M. orbicularis* 449 7: *M. polymorpha* 1123 8: *M. polymorpha* 612

بازوی کوچک کروموزوم ٦ دارای بیشترین ضریب عاملی بوده و در نتیجه متنوع‌ترین صفات می‌باشند. در نتیجه کروموزوم‌های ٥، ٦ و ٧ که جزء کوچک‌ترین کروموزوم‌های ژنوم بودند به دلیل داشتن بیشترین تنوع در اکثر صفات مورد بررسی بیشترین تغییرات را متحمل شده‌اند که خود نشان می‌دهد در فرایند تغییرات ژنومی، کروموزوم‌ها به صورت تصادفی و یکسان دچار تغییرات ساختمانی نمی‌شوند بلکه برخی کروموزوم‌ها تغییرپذیری بیشتر داشته و برخی پایدارتر می‌باشند (جدول ٨). همچنین در گونه‌هایی که دارای 2x=16 کروموزوم بودند متنوع‌ترین صفات کاریوتیپی عبارت بودند از طول کل کروموزوم‌های ١، ٢، ٣، ٤، ٥، ٦، ٧ و ٨، طول بازوی بزرگ کروموزوم‌های ٢، ٣، ٤، ٥، ٦، ٧ و ٨، طول بازوی کوچک کروموزوم‌های ٢، ٥ و ٧. در نتیجه کروموزوم‌های ٢، ٥ و ٧ با داشتن بیشترین تنوع در اکثر صفات مورد بررسی بیشترین تغییرات را متحمل شده‌اند (جدول ٩). به منظور تعیین تقارن کاریوتیپ‌ها از دو فاکتور ضریب تغییرات (CV) و درصد کل فرم (TF) استفاده شده است. با توجه به آماره CV و نتایج جدول ١ چنین استنباط می‌شود که نمونه 612 *M. polymorpha* دارای بیشترین مقدار CV و در نتیجه بیشترین اختلافات بین کروموزومی بوده و در عوض نمونه 1128 *M. rigidula* دارای کمترین مقدار CV بوده است که نشان می‌دهد این رقم از لحاظ طول کروموزوم‌ها یکنواخت‌تر از دیگر شماره نمونه‌ها و گونه‌های مورد تحقیق می‌باشد. براساس درصد کل فرم TF نمونه 316 *M. minima* دارای متقارن‌ترین کاریوتیپ و نمونه 1126 *M. rigidula* دارای نامتقارن‌ترین کاریوتیپ می‌باشند به عبارتی نمونه 316 *M. minima* دارای بیشترین تعداد کروموزوم متاسنتریک بوده و نمونه 1126 *M. rigidula* دارای کمترین تعداد کروموزوم متاسنتریک می‌باشد. با توجه به نتایج حاصله (گونه‌هایی که میانگین طول کروموزوم کوچک‌تری داشتند متقارن‌تر بودند) به نظر می‌رسد بین اندازه کروموزوم و تقارن کاریوتیپ همبستگی منفی وجود داشته باشد یعنی با افزایش اندازه کروموزوم‌ها از میزان یکنواختی آن‌ها کاسته می‌شود و این می‌تواند ناشی از بیشتر بودن نسبت تعداد کروموزوم‌های دارای سانترومر میانی در گونه‌هایی با میانگین طول کروموزوم کوچک باشد.

منابع مورد استفاده **References**

احمدیان‌تهرانی، پ. ١٣٧٦. سیتوژنتیک، کروموزوم در حال تقسیم، توارث و تکامل. انتشارات دانشگاه تهران. ٧٠٢ صفحه.

سندگل، ع. ۱۳۷۰. مقایسه عملکرد محصول توام با بررسی فصل کاشت یونجه‌های یکساله بومی و بیگانه در منطقه گرگان . انتشارات مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع. ٤۷ صفحه.

سندگل. ع.، و ملک پور، ب. ۱۳۷۳. مروری بر تحقیقات انجام شده و در حال اجرا در ارتباط با یونجه‌های یکساله در ایران و تدوین برنامه کار برای آینده. انتشارات مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع. ۲۲ صفحه.

شافعی، ع. ۱۳۷٦. بررسی تنوع ژنتیکی در تعدادی از ارقام یونجه مرتعی با استفاده از روش‌های سیتوژنتیک و الکتروفورتیک. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه تربیت مدرس.

سندگل، ع.، و ملک‌پور، ب. ۱۳۷۱. اصول زراعت و انتخاب گونه و ارقام مناسب یونجه‌های یکساله در مراتع و مناطق دیم ایران (ترجمه). انتشارات مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع. ٦۹ صفحه.

هنرور، م. ۱۳۷۵. بررسی جنس Solanum (سیتولوژی، الکتروفورز و تاکسونومی عددی). پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه شهید بهشتی.

Helser, C. B., and Whitaker, T. W. 1948. Chromosome number polyploidy and growth habit in california weed. American Journal of Botany 35: 179-186.

Heyn, C. 1965. Some choromosome counts in the genus Medicago. Caryologia 9: 160-165.

Sheidai, M., Masoumii, A. R., and Pakravan, M. 1996. Karyological studies of some Astragalus taxa . The Nucleus 39: 111-113.

Simon, J. P., and Simon, A. 1965. Relationship in annual species of Medicago. Australian Journal of Botany 15: 53-73.

آدرس نگارندگان:

احمد موسی‌پور گرجی- بخش تحقیقات سیب‌زمینی و پیاز، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، صندوق پستی ٤۱۱۹، کرج ۳۱۵۸۵.

مسعود شیدائی- آزمایشگاه سیتوژنیک، دانشکده علوم دانشگاه شهید بهشتی، تهران.

پریچهر احمدیان تهرانی- گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، کرج.

حسین میرزائی ندوشن- مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، صندوق پستی ٤۱۱۹، کرج ۳۱۵۸۵.