

Evaluation of Genetic Diversity and Relationships of *Trifolium tomentosum* based on CDDP Method in Iran

Maryam Haerinasab*

Department of biology, Payame Noor Universtiy, Tehran, IRAN

Abstract

Trifolium tomentosum L. is an annual plant in the Mediterranean and western part of the Iran-Turanian region, which is also found in the west and southwest of Iran. Due to its high tolerance to saline and flood soils and the suitability of feeding livestock, this can be a good alternative to rangeland rejuvenation. This species has three varieties of *tomentosum*, *curvisepalum* and *chthonocephalum* in Iran. This study investigates genetic variation and relationships in 40 individuals from 10 populations of this species using CDDP method. Out of 12 primers, 117 bands were obtained, of which 115 (98.29%) were polymorphic. Based on the results of cluster analysis, the samples were classified into two distinct groups, the first cluster including var. *tomentosum* and the second cluster including *curvisepalum* and *chthonocephalum* varieties. The mean genetic variation of Nie (H) and Shannon's information index (I) were highest in var. *chthonocephalum*. The analysis of molecular variance also showed that the intra-population genetic diversity (62%) was higher than inter-population genetic variation (38%), which confirms the outbreeding of this species. In general, according to the results of this study, *curvisepalum* and *chthonocephalum* varieties of *T. tomentosum* are more similar, which are not consistent with the results of older studies based on SSR and IRAP markers, and it can be said that the varieties of *T. tomentosum* are very similar and the molecular markers cannot separate the varieties of this species well.

Key words: Iran, Genetic Diversity, *Trifolium Tomentosum*, CDDP Method.

* m.haerinasab@pnu.ac.ir

ارزیابی تنوع ژنتیکی و روابط خویشاوندی گونه *Trifolium tomentosum* با استفاده از روش CDDP در ایران

مریم حائری نسب *

استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

چکیده

گونه *Trifolium tomentosum* L. گیاهی یک‌ساله در ناحیه مدیترانه و غرب ناحیه ایرانی - تورانی است که در غرب و جنوب غرب ایران نیز یافت می‌شود. این گونه به علت تحمل زیاد نسبت به خاک‌های شور و غرقابی و مناسب بودن برای تغذیه دام گزینه مناسبی برای احیای مراتع و دارای سه وارته *curvisepalum tomentosum* و *chthonocephalum* در ایران است. پژوهش حاضر به بررسی میزان تنوع ژنتیکی و روابط خویشاوندی فروگونه‌ای با استفاده از روش CDDP در ۴۰ فرد از ۱۰ جمعیت این گونه پرداخته است. از مجموع ۱۲ آغازگر ۱۱۷ باند حاصل شد که از این میان، ۱۱۵ باند (۹۸/۲۹ درصد) چندشکل بودند. بر اساس نتایج تجزیه خوشه‌ای، افراد در دو گروه مجزا طبقه‌بندی شدند که خوشه اول شامل وارته *tomentosum* و خوشه دوم شامل وارته‌های *curvisepalum* و *chthonocephalum* بود. بیشترین میانگین تنوع ژنتیکی نی (H) و شاخص اطلاعاتی شانون (I) در وارته *chthonocephalum* مشاهده شد. تجزیه واریانس مولکولی نیز نشان داد تنوع ژنتیکی درون‌جمعیتی (۶۲ درصد) بیشتر از تنوع ژنتیکی بین‌جمعیتی (۳۸ درصد) است که مؤید دگرلقاح بودن این گونه است. به‌طور کلی بر اساس نتایج پژوهش حاضر، وارته‌های *curvisepalum* و *chthonocephalum* از گونه *T. tomentosum* شبیه‌ترند که با نتایج مطالعه‌های قدیمی‌تر بر مبنای نشانگرهای SSR و IRAP همخوانی ندارد و از این رو، وارته‌های *T. tomentosum* بسیار شبیه‌اند و نشانگرهای مولکولی استفاده‌شده نمی‌توانند وارته‌های این گونه را به‌خوبی جدا کنند.

واژه‌های کلیدی: ایران، تنوع ژنتیکی، *Trifolium tomentosum*، روش CDDP.

مقدمه

چندشکلی زیادی است؛ به‌طوری‌که بر اساس نظر Zohary و Heller (۱۹۷۰ و ۱۹۸۴) دارای شش وارته شامل *T. tomentosum* var. *tomentosum* (Tackh) و *T. tomentosum* var. *curvisepalum* (Thieb)، *T. tomentosum* var. *chthonocephalum*.

گونه *Trifolium tomentosum* L. گیاهی یک‌ساله، خودلقاح و متعلق به خانواده Fabaceae است (Taylor and Gillett, 1988). این گونه دارای

* m.haerinasab@pnu.ac.ir

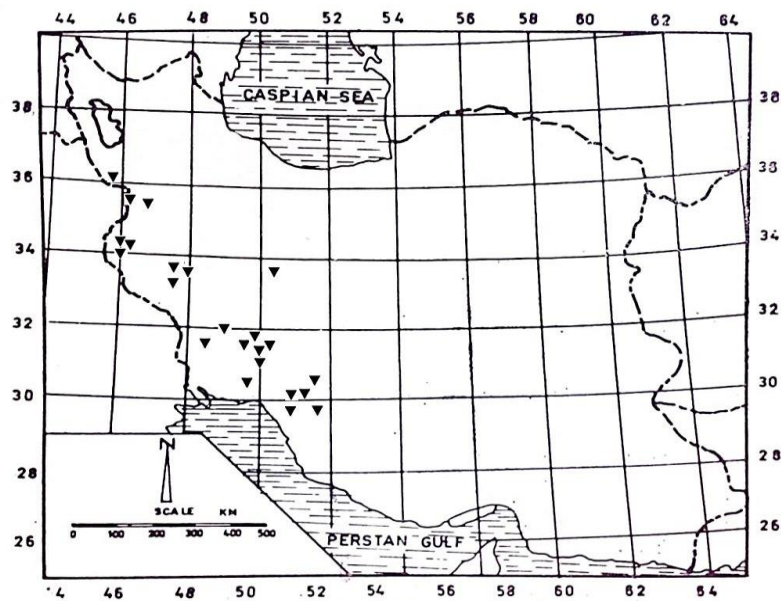
است. در سال ۲۰۱۲، دو واریته *tomentosum* و *curvisepalum* بر اساس نتایج مطالعه‌های ریخت‌شناسی و مولکولی بر مبنای نشانگرهای SSR و IRAP در هم ادغام شدند و واریته *chthonocephalum* برای نخستین بار از ایران گزارش شد (Haerinasab, 2012; Haerinasab and Rahiminejad, 2012). در واریته *chthonocephalum* گل‌آذین‌ها همگی در قاعده گیاه مجتمع‌اند و برگ‌های دارای دم‌برگ طویل بالاتر از آنها قرار می‌گیرند. کلید شناسایی ارائه‌شده برای سه واریته در مونوگراف جنس *Trifolium* به شرح زیر است (Zohary and Heller, 1984):

T. tomentosum var. *lanatum* Zoh. ,Bornm. و *T. tomentosum* var. *orientale* Bornm. *T. tomentosum* var. *philistaeum* Zoh. تفاوت عمده واریته‌های یادشده در طول دم‌گل‌آذین‌ها، قطر گل‌آذین‌ها، تراکم و رنگ پوشش کرکی کاسه گل، طول و شکل دندان‌های کاسه است. تصاویر سیاه‌قلم این واریته‌ها در مونوگراف جنس *Trifolium* آورده شده است (Zohary and Heller, 1984). در فلورا ایرانیکا (Heller, 1984) تنها دو واریته *tomentosum* و *curvisepalum* برای ایران گزارش شده است که بلندتر بودن دندان‌های پایینی کاسه در واریته *curvisepalum* بارزترین تفاوت آنها

-
- ۱- گل‌آذین در مرحله میوه نسبتاً تنک و لوب‌دار (کاسه‌های میوه قدری جدا از هم و واگرا در بخش بالایی)، دندان‌های بالایی کاسه ریش‌مانند، به شدت خمیده به پشت و پیش آمده از سطح گل‌آذین با گردن کاسه مخروطی یا استوانه‌ای، گل‌آذین‌ها در حالت میوه بخشی بدون دم‌گل‌آذین و بخشی روی دم‌گل‌آذین‌های اکثراً ۱ تا ۱/۵ سانتی‌متری. برگچه‌های بالاتر وازسه گوش طویل، گوه‌ای و گیاهان بیابان.
-
- ۲- گل‌آذین‌ها در مرحله میوه به‌طور یکنواخت کروی. دندان‌های کاسه‌مانند بالا نیست.
-
- ۲- گل‌آذین‌ها همگی مجتمع در قاعده گیاه و برگ‌های با دم‌برگ طویل بالاتر از آنها قرار می‌گیرند.
-
- ۲- گل‌آذین‌ها در طول یا در رأس ساقه‌ها و انشعابات، گل‌آذین‌ها در مرحله میوه کرکی نرم، با رگ‌بندی مشبک قابل‌رؤیت. دندان‌های بالایی کاسه افقی، اغلب فشرده به لوله. دم‌گل‌آذین‌ها واضح، خمیده به پایین.
-

آسیا و شمال آفریقا است و دامنه پراکنش محدود و مشخصی در کشور ایران دارد و تنها در غرب و جنوب‌غرب ایران یافت می‌شود (شکل ۱)؛ به عبارتی دارای خزانه وراثتی پیوسته‌ای در غرب و جنوب‌غرب کشور است (Haerinasab, 2012).

T. tomentosum یکی از گونه‌های مرتعی و خوش‌خوراک برای تغذیه دام است و باتوجه به مقاومت زیادی که نسبت به خاک‌های شور و غرقابی دارد گزینه مناسبی برای احیای مراتع است (Marticorena and Quezada, 1985). این گیاه بومی اروپا، غرب



شکل ۱- پراکنش جغرافیایی *Trifolium tomentosum* L. در ایران (Haerinasab, 2012)

آن با استفاده از علم بیوانفورماتیک وجود دارد. CDDP به آسانی نشانگرهایی کاربردی فراهم می‌کند که به فنوتیپ گیاه وابسته‌اند. اگرچه نواحی محافظت‌شده معمولاً دارای توالی یکسان و یا بسیار مشابه‌اند، تفاوت توزیع آنها در سراسر ژنوم چندشکلی‌های زیادی را آشکار می‌کند (Poczai *et al.*, 2011). روش یادشده بر اساس تک‌آغازگرهای بلند با دمای اتصال زیاد طراحی شده است که سبب کاهش میزان خطا در اتصال آغازگر و افزایش تکرارپذیری آن می‌شود (Collard and Mackill, 2009). در این روش همانند روش‌های دیگر مانند RAPD و ISSR طراحی آغازگرها بر اساس توالی ابتدا و انتهای قطعه‌های DNA انجام می‌شود با این تفاوت که در این روش قطعه‌های تکثیرشده نواحی حفاظت‌شده یک ژن خاص‌اند. ساده‌بودن، نیاز به کمترین امکانات آزمایشگاهی و نیاز به DNA الگوی بسیار کمتر نسبت به سایر روش‌ها از مزایای این روش و

نشانگرهای ژنتیکی اطلاعات مفیدی درباره مقدار و شیوه توزیع تنوعات ژنتیکی درون و بین جمعیت‌ها فراهم می‌کنند (Belletti *et al.*, 2008) و ابزار کارآمدی برای توصیف و کمی‌کردن تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها هستند (Avisé, 1994). در سال ۲۰۰۹، روش CDDP (Conserved DNA-Derived Polymorphism) روش جدیدی برای تهیه نشانگرهای گیاهی بر پایه نواحی حفاظت‌شده DNA معرفی شد (Collard and Mackill, 2009). روش CDDP روشی است که در آن با استفاده از نواحی بسیار حفاظت‌شده پروتئین‌ها و طراحی آغازگرهایی بر اساس این نواحی اقدام به تکثیر DNA می‌شود. این پروتئین‌ها معمولاً حاصل بیان ژن‌های عملکردی رایج مانند ژن‌های کدکننده هومئوباکس (KNOX) یا پروتئین متصل‌شونده به اکسین (ABPI) هستند (Poczai *et al.*, 2013). این روش ژن‌هایی را هدف قرار می‌دهد که به‌طور مستقیم در پاسخ گیاه به تنش‌های زنده و غیرزنده درگیر هستند؛ هرچند امکان افزایش دادن دامنه کاربرد

T. tomentosum var. *curvisepalum* و ۳ جمعیت به *chthonocephalum* var. *chthonocephalum* تعلق داشتند. اطلاعات مربوط به جمعیت‌های بررسی شده در جدول (۱) دیده می‌شود. جمع‌آوری‌ها به شکلی انجام شدند که تاحدامکان کل دامنه پراکنش این گونه در ایران را پوشش دهند. نمونه‌های سند در هر بار یوم دانشگاه اصفهان نگهداری می‌شوند.

در مطالعه حاضر، استخراج DNA به روش Lefort و Douglas (۱۹۹۹) انجام شد. غلظت نمونه‌های DNA از طریق مقایسه موقعیت و شدت باند حاصل از DNA با الگوی باندهندی حاصل از نشانگر λ تعیین شد. واکنش PCR در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر انجام شد و مخلوط واکنش PCR شامل ۰/۸ میکرومول آغازگر، بافر 1x PCR، ۰/۲۴ میلی‌مول مخلوط dNTP، ۱/۵ میلی‌مول $MgCl_2$ ، ۰/۵ واحد آنزیم *Taq polymerase* و ۲۵ نانوگرم DNA ژنومی بود. برنامه PCR به این شکل انجام شد: ۴ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، به دنبال آن ۳۵ چرخه شامل ۱ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه در ۵۰ درجه سانتی‌گراد، ۲ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و در نهایت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد.

پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، محصولات PCR روی ژل آگارز ۲ درصد برده شدند. باندهای تکثیرشده در دستگاه ژل‌داک مشاهده و عکس‌برداری شدند. در این بررسی، از مجموع ۱۶ آغازگر استفاده شده تنها ۱۲ آغازگر باندهای قابل‌امتیازدهی تکثیر کردند (جدول ۲).

تولید چندشکلی کمتر و نیاز به دانستن توالی DNA از معایب آن‌اند (Poczai et al., 2011; Li et al., 2013) (Hajibarat et al., 2013) (*Cicer arietinum* L. 2015) (Li *Chrysanthemum morifolium* Ramat., 2015) (Poczai *Solanum dulcamara* L. et al., 2013) (et al., 2011) از محدود گیاهانی هستند که با این روش بررسی شده‌اند.

تاکنون نشانگرهای مولکولی به‌طور خاص در گونه *T. tomentosum* استفاده نشده‌اند و یکی از دلایل احتمالی آن تعدد گونه‌های زراعی مهم از جمله *T. pratense* و *T. repens* در این جنس است که بیشتر مطالعه‌ها را به خود معطوف کرده‌اند. از سوی دیگر، قرارگیری کشور ایران در اقلیم خشک و نیمه‌خشک و لزوم توجه و حفاظت از مراتع ارزشمند کشور با استفاده از گیاهان مفید، *T. tomentosum* را گیاهی خوش‌خوراک برای دام و مقاوم به شوری در اولویت انتخاب برای احیای مراتع قرار می‌دهد. نظر به اینکه تاکنون مطالعه‌ای درباره تنوع ژنتیکی این گونه مهم انجام نشده است و اطلاعات موجود تا حد زیادی مخدوش و غیرقابل استناد است، در پژوهش حاضر برای بررسی تنوع ژنتیکی این گونه و روابط خویشاوندی در سطح فرگونه‌ای از نشانگر CDDP (نشانگری نسبتاً جدید و احتمالاً با کارایی زیاد) استفاده شد.

مواد و روش‌ها

در پژوهش حاضر، ۴۰ فرد از ۱۰ جمعیت مطالعه شدند که در این میان، ۵ جمعیت به *T. tomentosum* var. *tomentosum* و ۲ جمعیت به *T. tomentosum*

جدول ۱- اطلاعات مربوط به جمعیت‌های مطالعه‌شده گونه *T. tomentosum*

ردیف	محل جمع آوری	ارتفاع از سطح دریا (m)	شماره هر بار یومی	کد جمعت
<i>T. tomentosum var. tomentosum</i>				
۱	خوزستان: ایزه به دهدز، سد کارون ۳	۹۵۳	17917 IUH	to15A
۲	فارس: نورآباد به کازرون، تنگه چوگان، شهر نیشابور	۸۳۴	17915 IUH	to91
۳	خوزستان: ملاثانی به شوشتر، ۴۹ کیلومتری شمال شرق اهواز	۵۸	17913 IUH	to81
۴	لرستان: بعداز تنگ ملاوی	۹۰۰	18052 IUH	to114
۵	بختیاری: سرخون به دهدز	۱۷۳۶	17912IUH	toH28
<i>T. tomentosum var. chthonocephalum</i>				
۶	خوزستان: دهدز به سرخون	۱۳۰۳	18045 IUH	ch17
۷	بختیاری: سرخون به دهدز، نزدیک سد کارون ۴	۱۱۱۶	17908 IUH	ch77
۸	خوزستان: جاده آغاچاری به بهبهان، حاشیه رودخانه مارون	۲۱۱	18050 IUH	ch86
<i>T. tomentosum var. curvisepalum</i>				
۹	کهگیلویه و بویراحمد: ۴۳ کیلومتری جاده گچساران به نورآباد	۸۴۱	17914 IUH	cu88A
۱۰	آذربایجان غربی: سردشت	۱۳۶۰	18046 IUH	cu33

جدول ۲- اطلاعات مربوط به آغازگرهای CDDP استفاده‌شده در پژوهش حاضر (Collard and Mackill, 2009)

نام ژن	عملکرد ژن	نام آغازگر	توالی آغازگر (5'→3')	Tm °C	CG%
WRKY	عامل رونویسی در عملکردهای تکاملی و فیزیولوژیکی	WRKY-F1	TGG CGS AAG TAC GGC CAG	۶۱	۶۶/۷
		WRKY-R3	GCA SGT GTG CTC GCC	۵۴	۷۳/۳
		WRKY-R3B	CCG CTC GTG TGS ACG	۵۴	۷۳/۳
MADS	کنترل‌کننده شروع و توسعه اندام گل	MADS-1	ATG GGC CGS GGC AAG GTG C	۶۶	۷۳/۷
		MADS-2	ATG GGC CGS GGC AAG GTG G	۶۶	۷۳/۷
		MADS-4	CTS TGC GAC CGS GAG GTG	۶۳	۷۲/۲
ABP1	کدکننده پروتئین متصل‌شونده به اکسین	ABP1-1	ACS CCS ATC CAC CGC	۵۴	۷۳/۳
MYB	ناشناخته (دخیل در متابولیسم ثانویه، تنش‌های زنده و غیرزنده، ریخت‌زایی سلولی)	MYB1	GGC AAG GGC TGC CGC	۵۷	۸۰/۰
ERF	عامل رونویسی دخیل در مسیر مقاومت به بیماری‌ها	ERF2	GCS GAG ATC CGS GAC CC	۶۲	۷۶/۵
KNOX		KNOX-1	AAG GGS AAG CTS CCS AAG	۵۸	۶۱/۱
		KNOX-2	CAC TGG TGG GAG CTS CAC	۶۱	۶۶/۷
		KNOX-3	AAG CGS CAC TGG AAG CC	۵۷	۶۴/۷

به‌عنوان روش مکمل آنالیز خوشه‌ای با نرم‌افزار GenAlex6.4 انجام شد. همچنین آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) که روشی برای مطالعه تنوع ژنتیکی و میزان چندشکلی بین و درون جمعیت‌ها است با نرم‌افزار GenAlex6.4 انجام شد.

تجزیه تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌های گونه *T. tomentosum* با نرم‌افزار Popgene32 به کمک ضریب تشابه Nie (۱۹۷۳) انجام شد. در این ارزیابی تعداد آلل‌های مشاهده شده (Na)، تعداد آلل‌های مؤثر (Ne)، شاخص تنوع ژنتیکی نی (H) و شاخص شانون (I) برای هر یک از جمعیت‌ها محاسبه شد. میزان شباهت یا تفاوت جمعیت‌ها به وسیله ماتریس فاصله با نرم‌افزار GenALEX 6.3 تعیین شد.

نتایج

تنوع ژنتیکی جمعیت‌هایی از سه واریته مطالعه‌شده گونه *T. tomentosum* با استفاده از ۱۲ آغازگر CDDP بررسی شد. از مجموع ۱۲ آغازگر استفاده شده ۱۱۷ باند تکثیر شد که از این تعداد، ۱۱۵ باند (به‌طور میانگین ۹۸/۲۹ درصد باندها) چندشکل بودند. میانگین تعداد باندهای تکثیرشده به ازای هر آغازگر و میانگین تعداد باندهای چندشکل برای هر آغازگر به ترتیب برابر ۹/۷۵ و ۸/۱۹ درصد بود. بیشترین تعداد باند چندشکل در آغازگر KNOX-2 با ۱۲ باند و کمترین تعداد در آغازگرهای WRKY-R3 و KNOX-1 با ۸ باند مشاهده شد. جمعیت ch86 با ۴۷ باند چندشکل و میانگین ۴۰/۱۷ درصد و جمعیت cu88A با ۳۰ باند چندشکل و میانگین ۲۵/۶۴ درصد به ترتیب بیشترین و کمترین تعداد باند را داشتند. ۱۰ آغازگر از ۱۲ آغازگر

باندهای مشاهده‌شده روی ژل‌ها برای انجام تحلیل‌های آماری در قالب ماتریسی از صفر و یک تنظیم شدند (حضور باند با عدد ۱ و نبود آن با عدد صفر در نظر گرفته شد). برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزارهای (V2.02) NTSYS، PopGene32، GenAlex6.4 و (V3.25) PowerMarker استفاده شد. در نرم‌افزار PowerMarker دو آلل a (برای حضور) و b (برای نبود) در نظر گرفته شدند و از نظر این دو آلل تمام جمعیت‌ها به شکل a/a و b/b هموزیگوت بودند. میانگین محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) بر اساس رابطه $PIC=1-\sum f_i^2$ با نرم‌افزار PowerMarker محاسبه شد که در این رابطه، f_i با فراوانی آلل نام برابر است (Botstein et al., 1980). همچنین شاخص نشانگر (MI) برای تمام آغازگرها طبق رابطه $MI=PIC.N.\beta$ محاسبه شد که N تعداد باندهای چندشکل و β درصد چندشکلی برای هر آغازگر است. شاخص قدرت تفکیک (Resolving power) برای هر آغازگر طبق رابطه $Rp=\sum I_b$ و میزان I_b نیز از رابطه $I_b=1-(2|0.5-P_i|)$ محاسبه شد که P_i درصد فراوانی یک آلل از هر باند است (Pawell et al., 1996).

دندروگرام با استفاده از نرم‌افزار NTSYS ضرایب Dice (D)، Jaccard (J) و Simple Matching (SM) ترسیم شد. به منظور سنجش میزان انطباق دندروگرام رسم‌شده با ماتریس تشابه، میزان همبستگی کوفنتیک برای هر یک از ضرایب یادشده محاسبه شد. دندروگرام رسم‌شده بر اساس ضریب Jaccard بیشترین میزان همبستگی ($r=0/۸۲$) را نشان داد و بنابراین دندروگرام بر اساس ضریب تشابه Jaccard رسم شد. به منظور استفاده بهینه و استخراج بیشترین اطلاعات از داده‌های حاصل، تجزیه به مختصات اصلی (PCoA)

ایجادشده بین ۱۰۰ تا ۲۰۰۰ جفت باز بود. در مجموع ۲ و به طور میانگین ۱۱/۲۵ درصد باند اختصاصی به وسیله آغازگرهای KNOX-1 و MADS-1 ایجاد شدند.

استفاده شده چندشکلی ۱۰۰ درصدی نشان دادند و آغازگرهای WRKY-F1 و ERF2 با ۸۸/۸۸ درصد کمترین درصد چندشکلی را داشتند. دامنه باندهای

جدول ۳- شاخص‌های تنوع ژنتیکی با استفاده از آغازگرهای CDDP در بررسی ۱۰ جمعیت از گونه *T. tomentosum*

ردیف	آغازگر	TNB	NPB	PPB%	NSB	PSB%	Rp	PIC	MI	دامنه تولید باند bp
۱	WRKY-R3	۸	۸	۱۰۰	۰	۰	۵/۵۴	۰/۳۹	۳/۱۲	۲۰۰-۱۵۰۰
۲	MADS-4	۱۰	۱۰	۱۰۰	۰	۰	۳/۶۹	۰/۴۸	۴/۸۰	۱۰۰-۱۷۰۰
۳	ABP1-1	۹	۹	۱۰۰	۰	۰	۴/۳۶	۰/۳۲	۲/۸۸	۲۰۰-۱۴۰۰
۴	WRKY-F1	۹	۸	۸۸/۸۸	۰	۰	۳/۱۳	۰/۳۰	۲/۴۰	۲۰۰-۱۵۰۰
۵	ERF2	۹	۸	۸۸/۸۸	۰	۰	۳/۶۰	۰/۲۵	۲/۰۰	۲۰۰-۲۰۰۰
۶	KNOX-1	۸	۸	۱۰۰	۱	۱۲/۵	۲/۵۴	۰/۴۹	۳/۹۲	۱۰۰-۲۰۰۰
۷	WRKY-R3B	۱۱	۱۱	۱۰۰	۰	۰	۲/۹۳	۰/۴۲	۴/۶۲	۳۰۰-۱۹۰۰
۸	MYB1	۹	۹	۱۰۰	۰	۰	۴/۳۸	۰/۴۷	۴/۲۳	۱۵۰-۲۰۰۰
۹	KNOX-2	۱۲	۱۲	۱۰۰	۰	۰	۶/۲۵	۰/۳۴	۴/۰۸	۴۰۰-۲۰۰۰
۱۰	KNOX-3	۱۱	۱۱	۱۰۰	۰	۰	۵/۷۳	۰/۳۶	۳/۹۶	۲۰۰-۱۹۰۰
۱۱	MADS-1	۱۰	۱۰	۱۰۰	۱	۱۰	۵/۹۵	۰/۵۲	۵/۲۰	۴۰۰-۲۰۰۰
۱۲	MADS-2	۱۱	۱۱	۱۰۰	۰	۰	۷/۴۴	۰/۳۲	۳/۵۲	۲۰۰-۱۷۰۰
	مجموع	۱۱۷	۱۱۵	۹۸/۲۹	۲	۱۱/۲۵	-	-	-	-
	میانگین	۹/۷۵	۹/۵۸	۸/۱۹	۰/۱۶	۱/۸۷	۴/۶۲	۰/۳۹	۳/۷۲	۱۰۰-۲۰۰۰

مقدار (۵/۲۰) و میزان شاخص نشانگر به طور میانگین برابر با ۳/۷۲ بود. میانگین محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) ۰/۳۹ به دست آمد که بیشترین آن به آغازگر MADS-1 با مقدار ۰/۵۲ و کمترین آن به آغازگر ERF2 با مقدار ۰/۲۵ مربوط بود (جدول ۳).

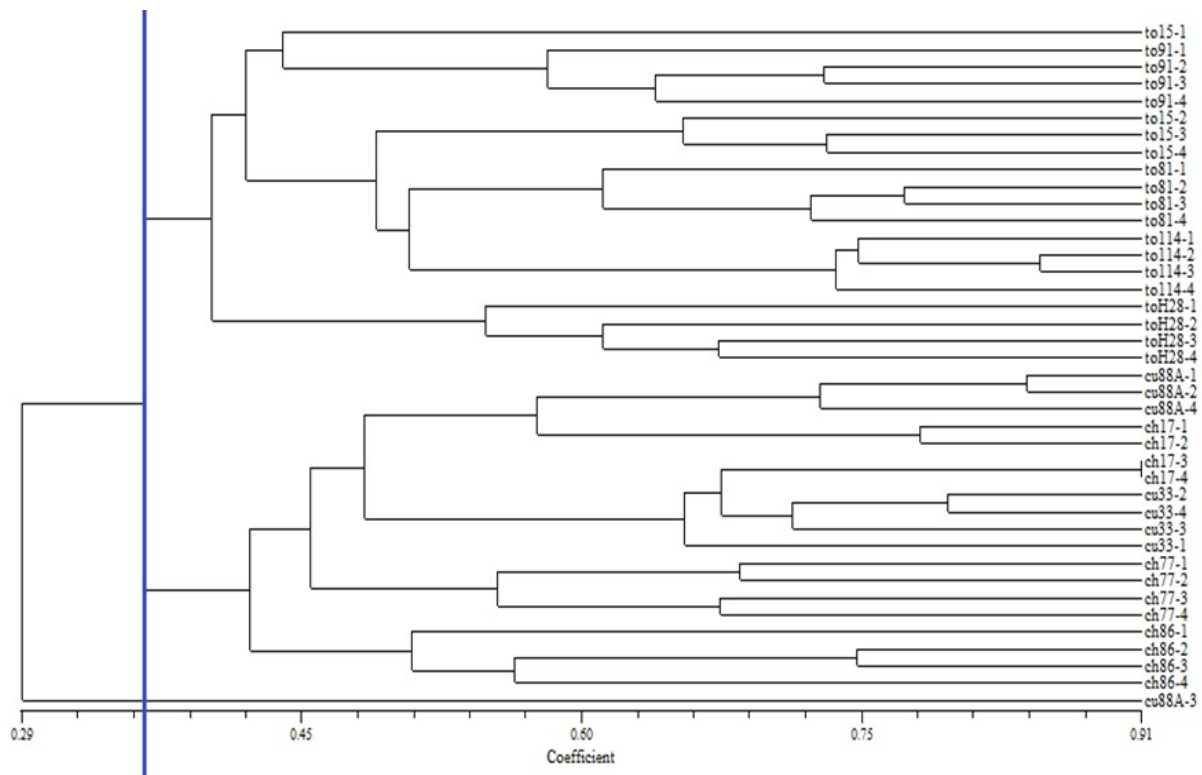
در دندروگرام حاصل از مطالعه حاضر، افراد در سطح تشابه ۳۶ درصد در دو خوشه دسته‌بندی شدند. در خوشه اول، پنج جمعیت از *T. tomentosum* var. *tomentosum* شامل جمعیت‌های to15، to91، to81، to114 و toH28 و در خوشه دوم، دو جمعیت از *T. tomentosum* var. *curvisepalum* شامل جمعیت‌های cu88A و cu33 و سه جمعیت از

TNB. تعداد کل نوارها، NPB. تعداد نوارهای چندشکل، PPB. درصد نوارهای چندشکل، NSB. تعداد نوارهای اختصاصی، PSB. درصد نوارهای اختصاصی، Rp. قدرت تفکیک، PIC. محتوای اطلاعات چندشکلی، MI. شاخص نشانگر. اطلاعات مربوط به آغازگرهای استفاده شده در جدول (۲) شرح داده شده است.

بیشترین میزان قدرت تفکیک (Rp) برابر با ۷/۴۴ در آغازگر MADS-2 و کمترین آن برابر با ۲/۵۴ در آغازگر KNOX-1 مشاهده شد. میانگین Rp در آغازگرهای آزموده شده برابر با ۴/۶۲ بود. شاخص نشانگر (MI) در آغازگر MADS-1 دارای بیشترین

(شکل ۲). نتایج آنالیز واریانس در جدول (۴) ارائه شده است.

T. tomentosum var. *chthonocephalum* شامل جمعیت‌های ch17، ch77 و ch86 قرار گرفتند.



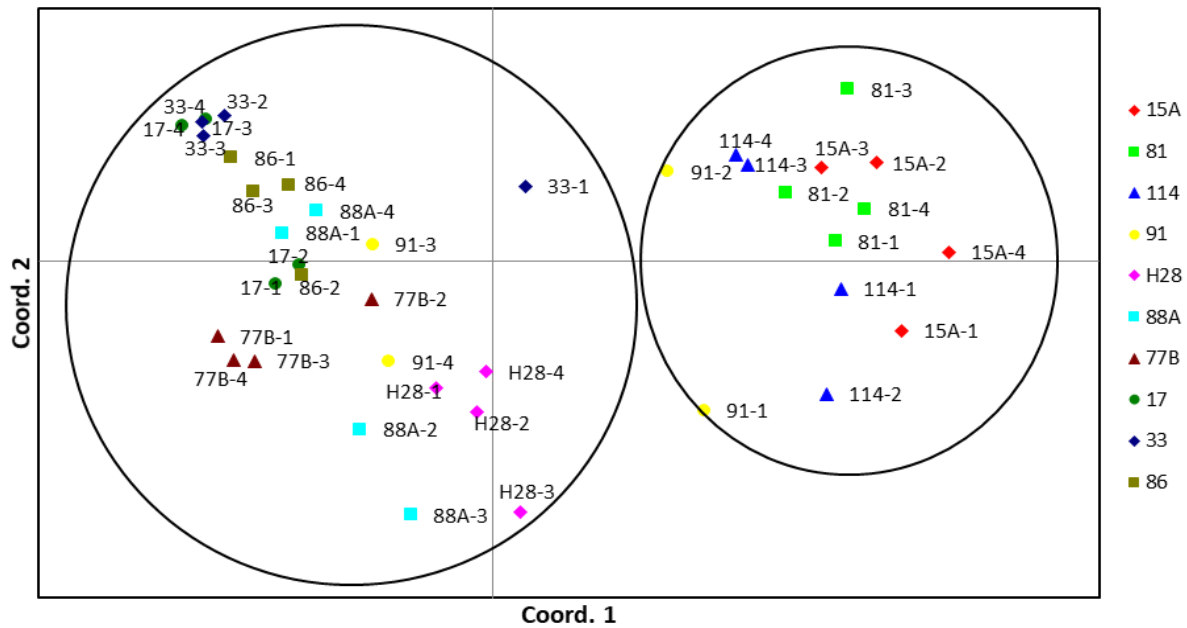
شکل ۲- دندروگرام حاصل از نرم‌افزار NTSYS و ضریب تشابه جاکارد بر اساس روش UPGMA در ۴۰ فرد از ۱۰ جمعیت گونه *T. tomentosum*. اطلاعات مربوط به جمعیت‌ها در جدول (۱) آمده است.

جدول ۴- آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) داده‌های حاصل از نشانگر مولکولی CDDP مربوط به ۴۰ فرد از ۱۰ جمعیت گونه *T. tomentosum*

منابع تنوع	درجه آزادی	میانگین مربع‌ها	انحراف معیار	درصد تنوع
درون جمعیتی	۳۰	۵۳۲/۰۰	۱۷/۷۳۳	۶۲٪
بین جمعیتی	۹	۵۴۵/۷۰	۱۰/۷۲۵	۳۸٪
کل	۳۹	۱۰۷۷/۷۰	۲۸/۴۵۸	۱۰۰٪

درصد واریانس کل را توجیه کردند. درصد تنوع محاسبه شده در هر محور اصلی در جدول (۵) ارائه شده است. بر اساس نتایج، محورهای اصلی اول، دوم و سوم در مجموع ۶۵/۴۲ درصد کل تنوع را توجیه می‌کنند.

برای تأیید و بررسی دقیق‌تر ارتباط بین و درون جمعیت‌ها از روش تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) استفاده شد که در شکل (۳) نشان داده شده است. نتایج PCoA کاملاً با نتایج تجزیه خوشه‌ای مطابقت داشتند. محورهای اول و دوم به ترتیب ۳۰/۲۱ و ۱۸/۹۰



شکل ۳- نمودار PCoA بر اساس تجزیه به مختصات اصلی حاصل از نرم افزار GenALEX در ۴۰ فرد از ۱۰ جمعیت (۴ فرد از هر جمعیت) گونه *T. tomentosum*

جدول ۶- شاخص های تنوع ژنتیکی در ۱۰ جمعیت از گونه

T. tomentosum

He	I	Ne	Na	جمعیت ها
۰/۱۲۷	۰/۱۸۹	۱/۲۲۱	۰/۹۰۶	to15A
۰/۱۱۱	۰/۱۶۱	۱/۲۰۱	۰/۷۹۵	to81
۰/۰۶۶	۰/۰۹۷	۱/۱۱۷	۰/۶۰۷	to114
۰/۱۳۵	۰/۱۹۷	۱/۲۴۲	۰/۸۶۳	to 91
۰/۱۱۳	۰/۱۷۱	۱/۱۸۸	۰/۸۷۲	to H28
۰/۰۹۹	۰/۱۴۶	۱/۱۷۵	۰/۸۱۲	cu88A
۰/۱۱۰	۰/۱۶۱	۱/۱۹۳	۰/۷۴۴	ch77B
۰/۱۱۲	۰/۱۶۵	۱/۱۹۵	۰/۸۹۷	ch 17
۰/۱۱۰	۰/۱۶۰	۱/۱۹۹	۰/۸۴۶	cu 33
۰/۱۵۶	۰/۲۳۰	۱/۲۷۷	۰/۹۸۳	ch 86
۰/۱۱۴	۰/۱۶۸	۱/۲۰۱	۰/۸۳۲	میانگین

تعداد آلل های مشاهده شده (Na)، تعداد آلل های مؤثر (Ne)، شاخص تنوع ژنتیکی نی (H)، شاخص شانون (I)

جدول ۵- درصد تنوع برای آغاز گرهای CDDP محاسبه شده

توسط سه محور اصلی در آنالیز PCoA

محور	۱	۲	۳
درصد تنوع	۳۰/۲۱	۱۸/۹۰	۱۶/۳۲
درصد تجمعی تنوع	۳۰/۲۱	۴۹/۱۰	۶۵/۴۲

بیشترین تعداد آلل مشاهده شده (Na) به جمعیت ch86 با ۰/۹۸۳ آلل و کمترین مقدار آن به جمعیت to114 با ۰/۶۰۷ آلل تعلق داشت. آلل های مؤثر (Ne) یعنی آلل هایی که دارای فراوانی برابر و توزیع خوبی هستند در جمعیت ch86 با ۱/۲۷۷ آلل بیشترین و در جمعیت to114 با ۱/۱۱۷ آلل کمترین مقدار را داشتند. میزان تنوع در جمعیت to86 با شاخص شانون (I) و شاخص نی (H) (H=۰/۲۳۰ و I=۰/۱۵۶) بیش از سایر جمعیت ها بود. جمعیت های to86 و to114 به ترتیب دارای بیشترین و کمترین تنوع پذیری و میزان پراکندگی نسبت به سایر جمعیت ها بودند (جدول ۶).

انتخابی را نشان می‌دهد (Kayis *et al.*, 2010). میزان Rp در آغازگر MADS-2 با ۷/۴۴ بیشترین مقدار را داشت و نشان می‌دهد این آغازگر نسبت به سایر آغازگرها دارای قدرت تفکیک بهتری است.

شاخص نشانگر (MI) برآورد مناسبی برای کارایی آغازگرها است که به تعداد باندهای چندشکل به‌دست آمده و به پوشش زیاد ژنوم توسط نشانگر نسبت داده می‌شود (Milbourne *et al.*, 1997). زیادبودن شاخص نشانگر نشان‌دهنده تولید تعداد بیشتری باند چندشکل و فراهم کردن اطلاعات بیشتری از ژنوم است (Spooner *et al.*, 2005). در پژوهش حاضر، بیشترین شاخص نشانگر (۵/۲۰) در آغازگر MADS-1 مشاهده شد که کارایی خوب این آغازگر نسبت به سایر آغازگرهای بررسی شده را نشان می‌دهد.

میانگین محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) در پژوهش حاضر برابر با ۰/۳۹ محاسبه شد. PIC یکی از شاخص‌های مهم برای مقایسه قدرت تمایز نشانگرهای مختلف است. مقادیر زیاد این شاخص بر چندشکلی زیاد در یک جایگاه دلالت دارد که دارای نقش بسزایی در تفکیک و تمایز افراد است (Thimmappaiah *et al.*, 2008). بیشترین مقدار میانگین محتوای اطلاعات چندشکلی در پژوهش حاضر به آغازگر MADS-1 با مقدار ۰/۵۲ و کمترین آن به آغازگر ERF-2 با مقدار ۰/۲۵ مربوط بود. مقادیر PIC از صفر تا یک متغیر هستند و هر چه اعداد به‌دست آمده بیشتر باشند بیان‌کننده فراوانی بیشتر چندشکلی برای آن جایگاه در نمونه‌های بررسی شده هستند (Wei *et al.*, 2005)؛ پس آغازگر MADS-1 با بیشترین مقدار PIC سطح تمایز بالاتری نسبت به سایر آغازگرهای بررسی شده دارد و توانایی آن در آشکارسازی چندشکلی بیشتر است؛ در

در ارزیابی ماتریس فاصله جمعیت‌های بررسی شده از گونه *T. tomentosum* که با نرم‌افزار GenAlex انجام شد بیشترین شباهت با فاصله ۰/۱۵۹ بین جمعیت ch17 از واریته *chthonocephalum* و جمعیت cu33 از واریته *curvisepalum* مشاهده شد و جمعیت to15A از واریته *tomentosum* و جمعیت ch77B از واریته *chthonocephalum* با میزان فاصله ۱/۰۹۸ بیشترین تفاوت را در بین جمعیت‌های بررسی شده نشان دادند.

بحث و نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر با استفاده از نشانگرهای CDDP تنوع بین و درون جمعیت‌های طبیعی گونه *T. tomentosum* ارزیابی شد. نتایج چندشکلی درخور توجهی (۹۸/۲۹ درصد) را در الگوهای باندهای به‌دست آمده نشان دادند.

از میان آغازگرهای آزموده شده، آغازگر KNOX-2 با ۱۲ باند دارای بیشترین تعداد باند چندشکل بود. باندهای منحصر به فرد (اختصاصی) در آغازگرهای KNOX-1 و MADS-1 دیده شدند. با توجه به اهمیت باندهای اختصاصی در شناسایی تاکسون‌ها و نیز طراحی نشانگرهای جدید مبتنی بر ارتباط این باندها و صفات‌های اختصاصی تاکسون‌های در حال تفرق (Roy, 2000) احتمالاً این دو آغازگر کارایی بیشتری در جداسازی تاکسون‌های این جنس نسبت به سایر آغازگرهای استفاده شده داشته‌اند.

شاخص قدرت تفکیک بهترین شاخص برای انتخاب آغازگر مناسب (Rp) است زیرا هم از تعداد افراد دارای باند و هم از تعداد آلل تأثیر می‌پذیرد (Prevost and Wilkinson, 1999). قدرت تفکیک (Rp) شاخصی است که توانایی تفکیک آغازگرهای

روش UPGMA مطابقت داشتند و دو دسته مجزا کاملاً مشهود بودند. دسته اول شامل واریته *tomentosum* و دسته دوم شامل واریته‌های *curvisepalum* و *chthonocephalum* بود که مؤید ارتباط نزدیک‌تر دو واریته *curvisepalum* و *chthonocephalum* است.

نتایج واریانس مولکولی نشان دادند از میزان کل واریانس مشاهده‌شده، ۳۸ درصد به تنوع بین جمعیت‌ها و ۶۲ درصد به تنوع درون جمعیت‌ها مربوط است. Taylor و Gillett (۱۹۸۸) از بین گونه‌های یک‌ساله بخش *fragifera* گونه *T. tomentosum* را خودلقاح دانستند. باتوجه به مقدار بیشتر تنوع درون جمعیتی (۶۲ درصد) نسبت به تنوع بین جمعیتی (۳۸ درصد) در آنالیز واریانس مولکولی به نظر می‌رسد برخلاف نظر Taylor و Gillett (۱۹۸۸)، گونه *T. tomentosum* مشابه گونه‌های *T. resupinatum* و *T. clusii* دگرلقاح باشد (Taylor and Gillett, 1988).

در بررسی تنوع ژنتیکی از طریق داده‌های مولکولی بهتر است آغازگرها توزیع یکنواخت و مناسبی در سطح ژنوم داشته باشند تا درحدممکن کل ژنوم را پوشش دهند؛ بنابراین، اگر آغازگرها از بخش‌های مختلف ژنوم انتخاب شده باشد همبستگی بین نتایج کم خواهد بود و تعداد محور بیشتری برای توجیه تنوعات آنها نیاز است (Hedrick, 2011). نتایج تجزیه به مختصات اصلی نشان دادند آغازگرهای استفاده‌شده در پژوهش حاضر تاحدی کل ژنوم را پوشش می‌دهند؛ زیرا بر پایه نتایج، محورهای اصلی اول، دوم و سوم در مجموع ۶۵/۴۲ درصد کل تنوع را توجیه می‌کنند که بر توزیع مناسب آغازگرها در ژنوم دلالت دارد.

نتایج بررسی حاضر تنوع ژنتیکی نسبتاً مطلوب بین جمعیت‌های مطالعه‌شده را نشان می‌دهند. بر اساس

حالی که آغازگر ERF-2 با کمترین مقدار PIC (۰/۲۵) سهم کمتری در جداسازی تاکسون‌ها دارد. طبق نظر Botstein و همکاران (۱۹۸۰) $PIC > 0.5$ نشان‌دهنده نشانگر بسیار کارآمد و $PIC > 0.25$ نشان‌دهنده نشانگر کارا و $PIC < 0.25$ نشان‌دهنده نشانگر دارای کارایی کم است. در پژوهش حاضر، مقدار PIC بین ۰/۲۵ و ۰/۵۲ و به‌طور میانگین برابر با ۰/۳۹ بود و باتوجه به نظر Botstein (۱۹۸۰) نشانگرهای CDDP در مطالعه حاضر کارا بودند.

نتایج پژوهش حاضر و میزان زیاد چندشکلی CDDP (۹۸/۲۹ درصد) باندهای حاصل از نشانگرهای CDDP نشان می‌دهند این روش برای مطالعه‌های تاکسونومیک و فیلوژنتیک در جنس *Trifolium* مناسب است. همچنین جمع‌بندی نتایج نشان می‌دهد نقش آغازگر MADS-1 در جداسازی افراد بررسی شده بیش از سایر آغازگرها است.

خوشه‌بندی حاصل از دندروگرام نشان می‌دهد واریته‌های *curvisepalum* و *chthonocephalum* باهم در خوشه دوم دسته‌بندی می‌شوند و واریته *tomentosum* به‌طور جداگانه در خوشه اول قرار می‌گیرد؛ درحالی‌که بر اساس مطالعه‌های پیشین با استفاده از نشانگرهای IRAP و SSR، واریته‌های *tomentosum* و *curvisepalum* باهم در یک گروه دسته‌بندی می‌شوند و واریته *chthonocephalum* به‌طور جداگانه دسته‌بندی می‌شود (Haerinasab, 2012)؛ از این‌رو، واریته‌های این گونه شبیه‌تر از آن هستند که به کمک این نشانگرها تفکیک شوند.

برای تأیید و بررسی دقیق‌تر ارتباط بین و درون جمعیت‌ها از تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) استفاده شد. نتایج PCoA با نتایج تجزیه خوشه‌ای بر اساس

به طور کلی، بر اساس نتایج به کارگیری روش CDDP واریته‌های *curvisepalum* و *chthonocephalum* به هم شبیه‌ترند و واریته‌های *tomentosum* و *chthonocephalum* شباهت و نزدیکی کمتری دارند. نتیجه یادشده با نتایج مطالعه‌های پیشین مبنی بر نشانگرهای IRAP و SSR همخوانی ندارد و از این رو، نشانگرهای مولکولی به کاررفته با وجود چندشکلی زیاد اغلب گزینه مناسبی برای مطالعه‌های فرگونه‌ای در گونه *T. tomentosum* و احتمالاً در سایر گونه‌های جنس *Trifolium* نیستند.

سپاسگزاری

نویسنده از حمایت‌های مالی دانشگاه پیام نور تشکر می‌کند. مقاله حاضر از نتایج طرح پژوهش اجراشده به شماره قرارداد ۰۳/۰۳۵/۸۶۶۶ برگرفته شده است.

نتایج، شاخص نی ۰/۱۱۴ درصد و شاخص شانون ۰/۱۶۸ درصد ارزیابی شد. بررسی تنوع در جمعیت‌های حاضر با نشانگرهای CDDP نشان داد بیشترین تشابه ژنتیکی بین جمعیت‌های ch17 از واریته *curvisepalum* و cu33 از واریته *chthonocephalum* است و به علت همین تشابه ژنتیکی بیشتر، این دو جمعیت در یک خوشه دندروگرام تجزیه خوشه‌ای قرار می‌گیرند. تشابه ژنتیکی بین جمعیت‌های یادشده و قرارگرفتن آنها در یک گروه از نزدیک بودن زمان پیدایش، مبدأ پراکنش یکسان و قرابت‌های ژنتیکی این واریته‌ها ناشی می‌شود.

بیشترین فاصله ژنتیکی بین جمعیت to15A از واریته *tomentosum* و جمعیت ch77B از واریته *chthonocephalum* دیده شد و به علت همین تفاوت ژنتیکی، دو جمعیت در دو خوشه متفاوت دندروگرام تجزیه خوشه‌ای بر اساس روش UPGMA قرار گرفتند.

منابع

- Avise, J. C. (1994) *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman and Hall, New York.
- Belletti, P., Monteleone, I. and Ferrazzini, D. (2008) A population genetic study in a scattered forest species, Wild service tree [*Sorbus torminalis* (L.) crantz], using RAPD marker. *European Journal of Forest Research* 127: 103-114.
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M. and Davis, R. W. (1980) Construction of genetic linkage map in man using restriction length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 32: 314-331.
- Collard, B. C. Y. and Mackill, D. J. (2009) Conserved DNA-Derived Polymorphism (CDDP): A Simple and novel method for generating DNA markers in plants. *Plant Molecular Biology Reporter* 27(4): 558-562
- Haerinasab, M. (2012) Genetic diversity and interspecific relationships studies among the species of the genus *Trifolium* L. section *Fragifera* Koch (*Vesicaria* Crantz) in Iran. PhD thesis, University of Isfahan, Isfahan, Iran (in Persian).
- Haerinasab, M. and Rahiminejad, M. R. (2012) A taxonomic revision of the genus *Trifolium* L. sect. *Fragifera* Koch (*Fabaceae*) in Iran. *Iranian Journal of Botany* 18(1): 22-30.
- Hajibarat, Z., Saidi, A., Hajibarat, Z. and Talebi, R. (2015) Characterization of genetic diversity in chickpea using SSR markers, start codon targeted polymorphism (SCoT) and conserved DNA-derived polymorphism (CDDP). *Physiology and Molecular Biology of Plants* 21(3): 365-373.
- Hedrick, P. W. (2011) *Genetics of populations*. Jones and Bartlett Learning, United states of America.

- Heller, D. (1984) *Trifolium*. In: Flora Iranica (Ed. Rechinger, K. H.) vol. 157. Akademische Druck-U Verlagsanstalt, Graz.
- Kayis, S. A., Hakki, E. E. and Pinarkara, E. (2010) Comparison of effectiveness of ISSR and RAPD markers in genetic characterization of seized marijuana (*Cannabis sativa* L.) in Turkey. African Journal of Agricultural Research 5(21): 2925-2933
- Lefort, F. and Douglas, G. C. (1999) An efficient micro-method of DNA isolation from mature leaves of four hardwood tree species *Acer*, *Fraxinus*, *Prunus* and *Quercus*. Annals of Forest Science 56: 259-263.
- Li, T., Li, Y., Ning, H., Sun, X. and Zheng, C. (2013) Genetic diversity assessment of *chrysanthemum* germplasm using conserved DNA-derived polymorphism markers. Scientia Horticulturae 162: 271-277.
- Marticorena, C. and Quezada, M. (1985) Catálogo de la Flora Vascular de Chile. Gayana Botánica 42: 1-157.
- Milbourne, D., Meyer, R., Bradshaw, J. E., Baird, E., Bonar, N., Provan, J., Powell, W. and Waugh, R. (1997) Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato. Molecular Breeding 3: 127-136.
- Nie, M. (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA 70(12): 3321-3323.
- Powell, W., Morganet, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S. and Rafalaski, A. (1996) The comparison of RFLP, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Molecular Breeding 2: 225-238.
- Poczai, P., Varga, I., Bell, N. E. and Hyvönen, J. (2011) Genetic diversity assessment of bittersweet (*Solanum dulcamara*, Solanaceae) germplasm using conserved DNA-derived polymorphism and intron-targeting markers. Annals of Applied Biology 159: 141-153.
- Poczai, P., Varga, I., Laos, M., Cseh, A., Bell, N., Valkonen, J. P. T. and Poczai J. H. (2013) Advances in plant gene-targeted and functional markers: a review. Plant Methods 9: 6.
- Prevost, A. and Wilkinson, M. J. (1999) A new system for comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. Theoretical and Applied Genetics 98: 107-112.
- Roy, D. (2000) Plant breeding: Analysis and exploitation of variation. Alpha Science International Ltd, India.
- Spooner, D., van Treuren, R. and de Vicente, M. C. (2005) Molecular markers for genebank management. IPGRI Technical Bulletin No. 10. Plant Genetic Resources Institute (now Bioversity International, Inc.), Rome.
- Taylor, N. L. and Gillett, J. M. (1988) Crossing and morphological relationships among *Trifolium* species closely related to strawberry and persian clover. Crop Science 28: 636-639.
- Thimmappaiah, W., Santhosh, G., Shobha, D. and Melwyn, G. S. (2008) Assessment of genetic diversity in cashew germplasm using RAPD and ISSR markers. Scientia Horticulturae 118: 1-7.
- Wei, Y. M., Hou, Y. C., Yan, Z. H., Wu, W., Zhang, Z. Q., Liu, D. C. and Zhang, Y. L. (2005) Microsatellite DNA polymorphism divergence in Chinese wheat landraces highly resistant to Fusarium head blight. Theoretical and Applied Genetics 46: 3-9.
- Zohary, M. and Heller, D. (1970) The *Trifolium* species of Sect. *Vesicaria* Crantz. Israel Journal of Botany 19: 314-335.
- Zohary, M. and Heller, D. (1984) The genus *Trifolium*. The Israel Academy of Science Humanities, Jerusalem.

