

بررسی تاکسونومی عددی *Trifolium resupinatum* L. (شبر ایرانی) و *Trifolium fragiferum* L. (شبر توت‌فرنگی) با استفاده از ریزماهوره‌های جدید

مریم حائری نسب^۱* و پیمان آقایی^۲

^۱ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

^۲ مربی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران ۴۶۹۷-۱۹۳۹۵، ج.ا. ایران

چکیده

Trifolium resupinatum و *T. fragiferum* دو گونه زراعی مهم تیره باقلانیان هستند. *T. fragiferum* به عنوان بخشی از خزانه وراثتی *T. resupinatum* در نظر گرفته شده است. در این مطالعه، ضمن بررسی انتقال‌پذیری زوج آغازگرهای *T. pratense* و *T. repens* به ژنوتیپ این دو گونه و معرفی نشانگرهای SSR (ریزماهوره‌های) جدید برای این گونه‌ها، میزان شباهت ژنومی آنها با استفاده از نشانگرهای SSR، به روش تاکسونومی عددی ارزیابی شد. نتایج حاصل از این مطالعه، حاکی از سطح بالای انتقال‌پذیری و چندشکلی ریزماهوره‌های معرفی شده برای *T. pratense* و *T. repens* به گونه‌های *T. fragiferum* و *T. resupinatum* بود. مطالعات نشان داد که در این گونه‌ها تنوع بین جمعیتی زیاد بوده، دو گونه در خوشه‌هایی با شباهت بسیار اندک دسته‌بندی شدند که نشانگر تفاوت ژنومی آنها در جایگاه‌های ژنی SSR آزموده شده است. این مطالعه نشان داد که ریزماهوره‌ها می‌توانند ابزار مفیدی برای بررسی تنوع ژنتیکی در این گونه‌ها باشند. نتایج این بررسی پیشنهاد می‌کند تا زمانی که جفت آغازگرهای SSR اختصاصی برای این دو گونه طراحی نشده است، می‌توان با ضریب اطمینان بالایی از آغازگرهای SSR به دست آمده از *T. pratense* و *T. repens*، برای تحلیل ژنوم در این گونه‌ها استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: شبر ایرانی (*Trifolium resupinatum*)، شبر توت‌فرنگی (*T. fragiferum*)، SSR، تحلیل

تاکسونومی عددی، ایران

مقدمه

Lindley یکی از مهم‌ترین جنس‌های گیاهی از نظر زراعی و تعداد گونه (۲۵۵ گونه در جهان) است (Ellison et al., 2006). این جنس خویشاوندی بسیار

جنس شبر (*Trifolium* L.) متعلق به طایفه Trifolieae Brongniart از تیره باقلانیان (Fabaceae)

گیاهی چندساله با عادت رشد به طور عمده خوابیده و دارای ساقه‌های رونده (stolon) است که علاوه بر تکثیر جنسی به وسیله بذر با قطعه قطعه شدن ساقه به طریق رویشی، قابلیت تکثیر دارد. با اینکه این گونه پتانسیل استفاده در سیستم‌های مرتع و چراگاهی را دارد، اما هنوز در کشور به عنوان گونه زراعی مورد استفاده قرار نگرفته است. این گونه به دلیل ساقه‌زایی بالا، فقدان گُرک در بیشتر جمعیت‌ها، نرمی بافت رویشی، تولید بیوماس بالا و سازگاری با خاک‌های شور و قلیایی (Taylor and Gillett, 1988) می‌تواند یکی از مناسب‌ترین گونه‌ها در مراتع و چراگاه‌های پایا باشد. همچنین، در صورت نیاز به‌نژادگران در برنامه‌های دو رنگ‌گیری با شبدر ایرانی استفاده شود (عباسی، ۱۳۸۷). دامنه پراکنش جغرافیایی *T. fragiferum*، اروپا، قبرس، ترکیه، ایران، قفقاز و سوریه است و در نواحی شمال، شمال غرب، غرب و مرکز ایران می‌روید، در حالی که *T. resupinatum* در نواحی بالکان، آسیای میانه، ترکیه، ایران، روسیه، عراق، سوریه، فلسطین و مصر گسترش یافته، در بخش‌های شمال، غرب، جنوب غرب و مرکز ایران پراکنده است (Heller, 1984).

ریزماهورها یا نشانگرهای مولکولی SSR شامل توالی‌های تکراری ساده با واحدهای ۱ تا ۶ نوکلئوتیدی هستند که به دلیل مزایای زیادی که نسبت به سایر نشانگرهای مولکولی دارند بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند. از جمله مزایای آنها می‌توان به کاربرد آسان، سادگی تفسیر نتایج، میزان بالای تنوع، فراوانی و تنوع زیاد آلل‌ها در سطح ژنوم یوکاریوت‌ها، الگوی توارث هم‌پارز و تکرارپذیر بودن نتایج اشاره کرد. این مزایا سبب شده تا این نشانگر مولکولی به طور وسیع در تهیه نقشه‌های ژنتیکی، تخمین تنوع ژنتیکی، مطالعه روابط

نزدیکی با جنس‌های *Medicago L.*, *Trigonella L.* و *Melilotus Miller* دارد. بدون شک، ناحیه مدیترانه‌ای مرکز کشت و به‌نژادی بیشترین گونه‌های زراعی جنس شبدر است (Zohary and Heller, 1984). گونه‌های مختلف جنس شبدر علاوه بر استفاده به صورت علوفه، به طور وسیع در زنبورداری و به ندرت به عنوان سبزیجات خوراکی و دارویی استفاده می‌شوند (Zohary and Heller, 1984). شبدر پس از یونجه (*Medicago*) مهم‌ترین گیاه علوفه‌ای دو لپه‌ای است که با سطح کشت حدود یکصد هزار هکتار جایگاه ویژه‌ای در کشور دارد (زمانیان، ۱۳۸۴) و باعث افزایش شدید نیتروژن خاک شده، مبنای تناوب کشت را تشکیل می‌دهد (جود و همکاران، ۱۳۸۲). مهم‌ترین گونه‌های زراعی جنس *Trifolium* در ایالات متحده که بیشترین کشت و زراعت شبدر را در جهان دارد گونه‌های *T. pretense* L. (شبدر قرمز)، *T. repens* L. (شبدر سفید)، *T. incarnatum* L. (شبدر لاک‌سی) و *T. hybridum* L. (شبدر دو رنگ) هستند (Taylor, 1985)، در حالی که در ایران مهم‌ترین گونه زراعی کشور با سطح زیر کشت حدود ۱۰۰ هزار هکتار *Trifolium resupinatum* L. (شبدر ایرانی) است (عباسی و زمانیان، ۱۳۸۴). شبدر ایرانی، گیاهی یک‌ساله با دو فصل رویش بهار و زمستان است. گونه *T. Clusii* Godr. & Gren. خزانه ژنی دوم و گونه *T. fragiferum* L. (شبدر توت‌فرنگی) خزانه ژنی سوم این گونه هستند (Taylor and Gillett, 1988). زمانی که به‌نژادگران نتوانند آلل‌های موردنظرشان را از خزانه ژنی اول (تمام ارقام و کولتیوارهای اصلاح شده جمعیت‌های بومی و جمعیت‌های خودرو در هر گونه زراعی) به دست آورند، خزانه‌های ژنی دوم و سوم را جستجو می‌نمایند (Fehr, 1987). شبدر توت‌فرنگی،

ریزماهوره‌های جدید در گونه‌های *T. resupinatum* و *T. fragiferum* معرفی گردید.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق، ۱۹ جمعیت خودرو شامل ۸ جمعیت از *T. fragiferum* و ۱۱ جمعیت از *T. resupinatum* ارزیابی شد. نمونه‌های جمعیتی به گونه‌ای انتخاب شد که تمامی دامنه پراکنش این گونه‌ها در ایران را پوشش دهد. مشخصات مربوط به این جمعیت‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است. نمونه‌ها در فصول رویشی سال‌های ۱۳۸۸ و ۱۳۸۹ به صورت بذر و نمونه هرباریومی توسط مؤلف جمع‌آوری و نمونه‌های سند به هرباریوم دانشگاه اصفهان (HUI) سپرده شد. نمونه‌ها بر اساس کلید ارائه شده در فلورا ایرانیکا (Heller, 1984) شناسایی شدند. بذرها در شرایط گلخانه‌ای کشت و DNA ژنومی از برگ‌های تازه و جوان استخراج گردید. استخراج DNA از این جمعیت‌ها با روش CTAB تغییر یافته (Lefort and Douglas, 1999) انجام گرفت.

غلظت DNA استخراج شده، توسط الکتروفورز افقی، مشاهده بر روی ژل آگاروز ۰/۸ درصد و مقایسه با الگوی نشانگر مولکولی λ III (Lambda III) با وزن مولکولی مشخص به عنوان شاهد ارزیابی شد.

در این تحقیق، ۲۲ جفت از آغازگرهای مشترک بین *T. pratense* و *T. repens* که با احتمال بیشتری قادر به تکثیر ریزماهوره‌ها و بیان تنوع ژنتیکی جمعیت‌های *T. resupinatum* و *T. fragiferum* هستند، انتخاب شدند (جدول ۲). انتخاب این آغازگرها بر اساس اشتراک بین دو گونه *T. pratense* و *T. repens*، چندشکلی و فراوانی آللی بالا صورت گرفت.

خویشاوندی و همچنین در برنامه‌های به‌نژادی در گیاهان مورد استفاده قرار گیرد. از جمله معایب این نشانگر پیچیدگی و صرف هزینه و وقت زیاد را می‌توان نام برد (نقوی و همکاران، ۱۳۸۴). در جنس شبدر، از این نشانگرها تنها در آنالیز ژنوم گونه‌های *T. pratense* و *T. repens* استفاده شده است (Sato et al., 2005؛ Zhang, Zhang et al., 2007؛ Dias et al., 2008؛ Sato, 2010) و همکاران (۲۰۰۵) و Zhang و همکاران (۲۰۰۷) با استفاده از نشانگرهای SSR به ترتیب نقشه ژنتیکی *T. repens* و *T. pratense* را تهیه نمودند. همچنین، تنوع ژنتیکی در *T. pratense* با استفاده از صفات ریخت‌شناختی و نشانگرهای SSR (Dias et al., 2008) و در *T. repens* بر پایه صفات ریخت‌شناختی، نشانگرهای SSR و RAPD (Zhang, 2010) ارزیابی شده است. بررسی منابع نشان می‌دهد که تاکنون تحقیقاتی در زمینه جداسازی، شناسایی و تعیین ردیف بازی توالی‌های تکراری ساده گونه‌های *T. resupinatum* و *T. fragiferum* انجام نشده است. به منظور رفع کمبود اطلاعات موجود در این زمینه می‌توان اقدام به جداسازی و توالی‌یابی این جایگاه‌های ژنی کرد و یا نسبت به بررسی انتقال‌پذیری آغازگرهای توالی‌های تکراری ساده (SSR) به دست آمده از گونه‌های خویشاوند در این گونه‌ها پرداخت. در این پژوهش، با توجه به کم هزینه‌تر بودن، سادگی و سرعت روش اخیر و همچنین تعدد مکان‌های توالی‌های تکراری ساده شناخته شده در دو گونه *T. pratense* و *T. repens*، انتقال‌پذیری آغازگرهای این دو گونه به ژنوتیپ‌های *T. resupinatum* و *T. fragiferum* به منظور بررسی میزان شباهت ژنتیکی این دو گونه ارزیابی شد و ریزماهوره‌های تکثیر شده به عنوان

جدول ۱- مشخصات نمونه‌های جمعیتی مطالعه شده از گونه‌های *T. fragiferum* و *T. resupinatum* = HUI در باغ‌های اصفهان

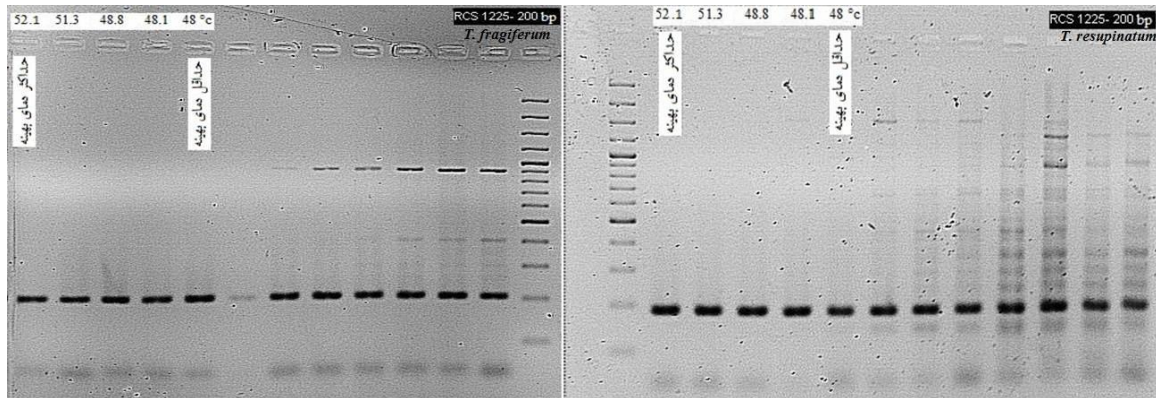
تاکسون	کد تاکسون	شماره هر باغیومی	تاریخ جمع‌آوری	ارتفاع از سطح دریا (متر)	محل جمع‌آوری
<i>T. fragiferum</i> var. <i>fragiferum</i>	Tff1	17836 HUI	۱۳۸۹/۰۴/۳۱	۲۱۰۸	تهران: فیروزکوه به پلور، ارجمند
	Tff2	17835 HUI	۱۳۸۸/۰۵/۲۹	۰	گلستان: گلگاه به گرگان، روستای النگ
	Tff3	17838 HUI	۱۳۸۸/۰۵/۱۴	۱۲۵۰	آذربایجان غربی: ۲۰ کیلومتری اهر به مشکین شهر، روستای نقاره کوب
	Tff 4	17847 HUI	۱۳۸۸/۰۵/۰۱	۱۹۲۹	لرستان: شول آباد
<i>T. fragiferum</i> var. <i>pulchellum</i>	Tfp1	17830 HUI	۱۳۸۸/۰۵/۱۴	۱۲۵۰	آذربایجان غربی: ۲۰ کیلومتری اهر به مشکین شهر، روستای نقاره کوب
	Tfp2	17833 HUI	۱۳۸۹/۰۴/۲۹	۰	مازندران: بهمنیر به قائم شهر
	Tfp3	17834 HUI	۱۳۸۸/۰۵/۱۲	۱۳۰۰	کردستان: ۶۰ کیلومتری پیرانشهر از سردشت، نرسیده به موسالان
	Tfp4	17839 HUI	۱۳۸۸/۰۵/۱۴	۱۷۷۰	آذربایجان غربی: دامنه سبلان، ۸ کیلومتری آبگرم قینرجه و موئیل
<i>T. resupinatum</i> var. <i>resupinatum</i>	Trr1	17895 HUI	۱۳۸۸/۰۲/۲۵	۱۱۰	خوزستان: ۵ کیلومتری جاده اندیمشک به شوش
	Trr2	17897 HUI	۱۳۸۸/۰۳/۰۸	۱۳۰۳	گلستان: علی آباد، سه راه کبودوال
	Trr3	17901 HUI	۱۳۸۹/۰۳/۲۱	۷۹	گیلان: ۱۷ کیلومتری رشت از قزوین - روستای جو کلبدان
<i>T. resupinatum</i> var. <i>microcephalum</i>	Trmi1	17893 HUI	۱۳۸۸/۰۲/۲۵	۹۴	خوزستان: ۲۰ کیلومتری جاده اندیمشک به شوش
	Trmi2	17892 HUI	۱۳۸۸/۰۳/۱۱	۳۳۰	مازندران: زیر آب به فیروزکوه، ۴ کیلومتری زیر آب
	Trmi3	17894 HUI	۱۳۸۹/۰۳/۲۵	۴۳	گیلان: رضوانشهر
<i>T. resupinatum</i> var. <i>majus</i>	Trma5	17903 HUI	۱۳۸۸/۰۲/۲۷	۸۲۸	خوزستان: ۵ کیلومتر جاده ایذه به دهدز
	Trma1	17887 HUI	۱۳۸۸/۰۳/۰۸	۲۰۰	گلستان: علی آباد به آزادشهر، ابتدای جاده زرین گل
	Trma2	17890 HUI	۱۳۸۸/۰۵/۰۲	۱۴۸۸	لرستان: درود
	Trma3	17886 HUI	۱۳۸۸/۰۲/۲۵	۸۷۹	لرستان: بعد از پل دختر - بین تنگ فنی و روستای ولیعصر
	Trma4	17883 HUI	۱۳۸۹/۰۱/۲۷	۴۲۴	خوزستان: باغ ملک به رامهرمز، بعد از رود زرد

جداگانه توسط PCR گرادیان تعیین شد و سپس با بررسی محصول PCR بهترین غلظت و مناسب‌ترین دما انتخاب گردید. محدوده گرادیان دمایی حداکثر بین ± 8 درجه سانتیگراد پایین‌ترین دمایی ذوب توصیه شده برای هر زوج آغازگر در نظر گرفته شد. برای هر زوج آغازگر یک محدوده دمایی بهینه از حداقل تا حداکثر

به منظور بهینه‌سازی، یعنی تعیین غلظت‌های مناسب مواد واکنش و دمای مناسب اتصال آغازگرها (T_a , annealing temperature) جهت به دست آوردن محصول PCR مناسب، غلظت اجزای واکنش PCR (یون منیزیم، غلظت DNA و آغازگرها) و نیز دمای اتصال در شرایط مختلف برای هر یک از آغازگرها

نبودند و یا نتوانستند قطعات DNA را تکثیر کنند. به همین دلیل نشدند (جدول ۲). ۹ زوج آغازگر که در PCR گرایان دارای محصول PCR مشخص بودند انتخاب و فرآیند PCR پس از تعیین دمای مناسب برای آنها انجام شد.

دمای بهینه تعیین گردید (شکل ۱)، به طوری که در بردارنده دمای بهینه اتصال برای هر دو گونه باشد. بنابراین، فرآیند PCR برای هر دو گونه به طور هم‌زمان انجام شد. از ۲۲ زوج آغازگر SSR استفاده شده، ۱۳ زوج از آنها دارای محصول PCR مشخص و منفرد



شکل ۱- تعیین دمای بهینه اتصال زوج آغازگر RCS-1225 بر روی ژنوم *T. fragiferum* و *T. resupinatum*

جدول ۲- توالی ۲۲ زوج آغازگر نشانگرهای SSR آزموده شده در ۱۹ جمعیت از گونه‌های *T. fragiferum* و *T. resupinatum* * آغازگرهایی که توانستند در این مطالعه ریزماهوره‌های مورد نظر را تکثیر کنند.

نام آغازگر	ردیف قطعه تکراری (motif)	توالی آغازگر پیرو (۵' → ۳')	توالی آغازگر پیشرو (۵' → ۳')
RCS0883 *	AAG	GAAGAGATAGCTTGCTTGGA	CACGTTACTCAATTTGGATCTTTG
RCS0907	AAC	TGGGGAAGTGAAGGATGTTC	ATTTGAGCACAAGGCCTCAC
RCS1479	AG	ATCAACTCGATGGGAACACC	TTTTCTGGCGACGAATTAGG
RCS2773	AAG	GATTCGATCCTCCTCCTCC	AATAACAATATGCGGCTTTGC
RCS0033	AAT	GCAGATTATGAGGAATAACATTG	AAATTATCATTTTGCAAATTTTA
RCS2343	AC	TTCAATCGGGAGTGTCAAGT	CGATTGCTACAAACACAGCC
RCS1735 *	AAC	GGTGCTAGCTCCAACCTCAG	CCTGCTCCGTACCATTGTTT
RCS2667 *	AAG	GGTGGTGTGCTGATTACGA	CCTCAGCAGAATCTTACCC
RCS1920*	AAG	CCCCAAAATACAAAACCTT	GAGAAAAGAAAGAAGTCTCTGAAGGA
RCS1928 *	AGC	CCTTTCAGAACAGATGGCGT	TACCTCTTGAGCACCCATT
RCS2202 *	AC	CGGCAGACGAAGTGACAAAT	GCCGATATTGCTAGGTTGGA
RCS1225 *	ATC	CTCGCTGAAGGAGGAAACAG	TGCAAACCTCCGCTTTATGC
RCS1737	ATC	AGCTCAAGCTCAACGGACAT	GGCACGAGGCACACTACTTC
RCS1518	ATC	CGAAGCAGGTTGGAAAACAT	GCACGAGGCACACACTACTT
RCS0843	GGAT	TTGGCATCTCAAAGCTGAAA	GCCAAGCCCACCAATACATA
RCS3666 *	AC	TCTGTTTCTTGCTCGGCCT	CATGGCTGCCTGAGGTTAAT
RCS3052	AAC	CACTAATTCAGACCACCAGCA	TCGGTGAGCTGTGACTAACG
RCS1327	ATC	AAACAAACCAAGCAGCACCT	ACGGTGGAATTATGGGATGA
RCS0793	AAG	TTCAACATGCAGGCTAAGAAAA	CGCAATCTTCTTCTCATTCA
RCS1897 *	AAAG	ATGAGCACCTTACCAATCC	CATGTCAGCATATCCATTTTCC
TRSSRATS054	-----	AATCACGACGAGCGACAACA	GACACCGATTATGTGCAAGA
TRSSRATS055	-----	TCTCTGCTTCGCGTCTTCTC	CAATACAATCACCGCACCAG

گروه‌بندی‌ها در دندروگرام‌های حاصل از این ضرایب مشاهده نشد. رسته‌بندی توده‌ها نیز با استفاده از تجزیه به مؤلفه‌های اول و دوم (PCA, Principle Coordinate Analysis) به وسیله نرم‌افزار GenAlex6 انجام شد.

بحث و نتیجه‌گیری

از میان ۲۲ جفت آغازگر مورد آزمایش، ۹ جفت توانستند ۴۶ آلل در جمعیت‌های گونه *T. fragiferum* و ۵۶ آلل در جمعیت‌های گونه *T. resupinatum* تکثیر کنند (جدول ۳) که بسیاری از این آلل‌ها بین دو گونه مشترک هستند. این نتیجه می‌تواند بیانگر شباهت زیاد ژنوم این دو گونه باشد.

از میان این آغازگرها، زوج آغازگر RCS1928 که قطعاتی از DNA گونه‌های *T. fragiferum* و *T. resupinatum* را تکثیر نمود، چه در درون گونه‌ها و چه در بین دو گونه، تنوعی نشان نداد (شکل‌های ۲ و ۳) که نشان می‌دهد این ریزماهواره در بخش‌هایی از ژنوم واقع شده است که در طول تکامل، توالی‌های خود را به شدت حفظ نموده است. زوج آغازگر RCS3666 در درون هر دو گونه تنوعی نشان نداد، ولی در بین دو گونه قطعات متفاوتی را تکثیر کرد که گویای وجود تفاوت ژنومی در این ناحیه از DNA دو گونه است (شکل‌های ۲ و ۳). زوج آغازگرهای RCS1920 و RCS1897 با این که در گونه *T. fragiferum* تنوعی نشان ندادند (شکل ۲)، ولی در گونه *T. resupinatum* به خوبی چندشکلی را آشکار ساختند (شکل ۳). بنابراین، می‌توان چنین نتیجه گرفت که نقاطی از ژنوم که در بردارنده این ریزماهواره‌هاست در گونه *T. fragiferum* در نواحی حفاظت شده واقع شده، در حالی که در گونه *T. resupinatum* در مسیر تکامل

به طور خلاصه، واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۲۵۰ نانومول از هر آغازگر، مخلوط dNTP با غلظت ۰/۲ میلی‌مولار، کلرید منیزیم با غلظت ۱/۵ میلی‌مولار، ۱/۲ واحد آنزیم *Taq polymerase* و ۵۰ تا ۱۰۰ نانوگرم DNA ژنومی از نمونه‌های مطالعه شده، انجام شد. برنامه PCR به این ترتیب بود: ۹۴ درجه سانتیگراد ۴ دقیقه؛ ۲۰ دور با ۹۴ سانتیگراد ۱ دقیقه، ۱ دقیقه در حداکثر دمای اتصال بهینه، ۷۲ درجه سانتیگراد ۱ دقیقه؛ ۱۵ دور با ۹۴ سانتیگراد ۱ دقیقه، ۱ دقیقه در حداقل دمای اتصال بهینه، ۷۲ سانتیگراد ۱ دقیقه؛ در پایان، ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه.

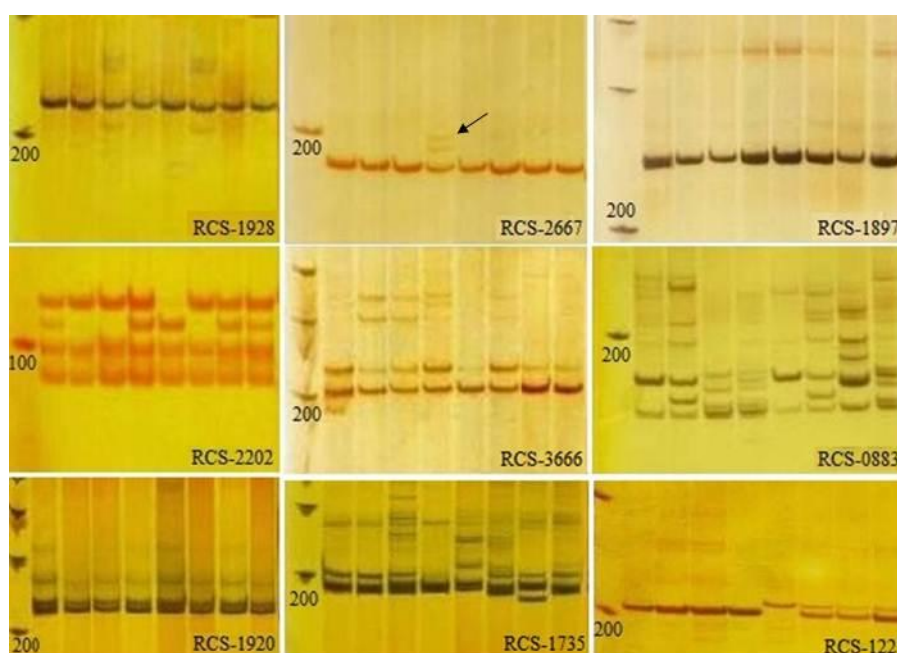
تفکیک باندهای حاصل ابتدا روی ژل آگاروز ۲ درصد حاوی اتیدیوم بروماید با ولتاژ ۱۰۰ ولت انجام شد و تهیه عکس با استفاده از دستگاه UV transiluminator صورت گرفت. برای تفکیک دقیق‌تر باندها از روش الکتروفورز عمودی با ژل پلی‌آکریل آمید ۱۲ درصد استفاده شد. رنگ آمیزی ژل پلی‌آکریل آمید با نیترات نقره و ظهور باندها به وسیله هیدروکسید سدیم انجام شد. تحلیل باندها با در نظر گرفتن هر شماره باند به عنوان یک صفت انجام گرفت. در ارزیابی تاکسونومی عددی هر باند با دو حالت وجود (۱)/غیاب (۰) ارزیابی شد. دندروگرام با استفاده از ضریب Dice، Jaccard (J) و Simple Matching (SM) ترسیم شد. به منظور سنجش میزان انطباق دندروگرام رسم شده با ماتریس تشابه، میزان همبستگی کوفنتیک برای هر کدام از ضرایب فوق، محاسبه شد. دندروگرام رسم شده با نرم‌افزار NTSYS_{pc} 2 بر اساس ضریب جاکارد، بیشترین میزان همبستگی ($r = 0.73$) را نشان داد. بنابراین، از این ضریب برای رسم دندروگرام به روش UPGMA استفاده شد. البته تفاوت‌های معنی‌داری در

جمعیت‌های این گونه (Tff4)، دو آللی را که این آغازگر تنها برای گونه *T. resupinatum* تکثیر کرده بود، نشان داد که می‌تواند بیانگر ردپایی از نفوذ گذشته باشد (شکل ۲، باندهای مربوط روی تصویر با پیکان نشان داده شده است).

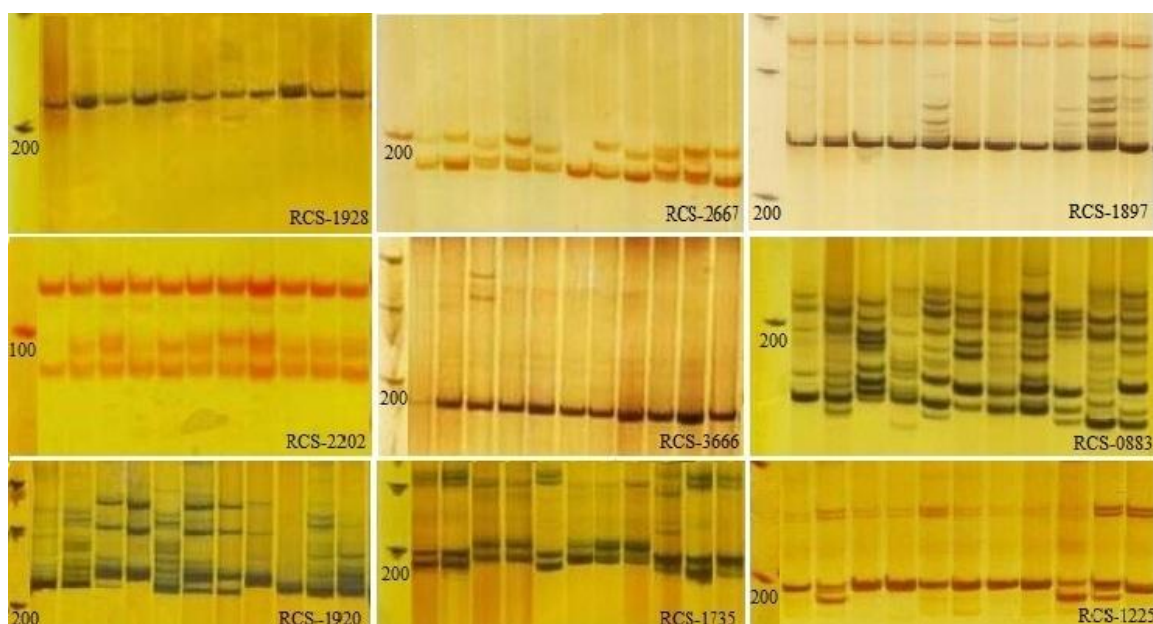
دستخوش تغییراتی شده است. به بیان دیگر، این ریزماهورها در بخش‌هایی از DNA واقع شده‌اند که در بین دو گونه از حیث ساختار و عملکرد متفاوت هستند. زوج آغازگر RCS2667 در گونه *T. fragiferum* تنوعی نشان نداد، اما یکی از

جدول ۳- مقایسه نتایج حاصل از تکثیر ۹ نشانگر SSR در ۱۹ جمعیت از گونه‌های *T. fragiferum* و *T. resupinatum*

ردیف	نام آغازگر	محدوده دمای اتصال بهینه (درجه سانتیگراد)	شبدر توت‌فرنگی (<i>T. fragiferum</i>)		شبدر ایرانی (<i>T. resupinatum</i>)	
			اندازه قطعات (bp)	تعداد آلل‌ها	اندازه قطعات (bp)	تعداد آلل‌ها
۱	RCS0883	۴۷-۵۵	۱۵۰-۲۳۰	۱۱	۱۵۰-۲۳۰	۱۲
۲	RCS1225	۴۸-۵۲	۱۹۰-۲۵۰	۵	۱۹۰-۲۵۰	۵
۳	RCS1735	۴۶-۵۲	۱۸۰-۳۱۰	۱۱	۱۸۰-۳۱۰	۸
۴	RCS1920	۴۶-۵۲	۲۲۰-۳۱۰	۴	۲۲۰-۳۶۰	۱۱
۵	RCS1928	۵۰-۵۸	۲۰۵-۲۵۰	۴	۲۰۵-۲۵۰	۴
۶	RCS2667	۴۸-۵۲	۱۹۰-۲۰۰	۳	۱۹۰-۲۰۰	۴
۷	RCS3666	۴۸-۵۲	۲۰۰-۲۳۰	۲	۱۹۰	۱
۸	RCS2202	۴۸-۵۱	۹۰-۱۲۰	۴	۹۰-۱۲۰	۵
۹	RCS1897	۴۸-۵۲	۲۴۰-۲۶۰	۲	۲۴۰-۲۹۵	۶
				= ۴۶		= ۵۶



شکل ۲- الگوی چندشکلی حاصل از تکثیر ۹ نشانگر SSR در ۸ جمعیت از گونه *T. fragiferum*



شکل ۳- الگوی چندشکلی حاصل از تکثیر ۹ نشانگر SSR در ۱۱ جمعیت از گونه *T. resupinatum*

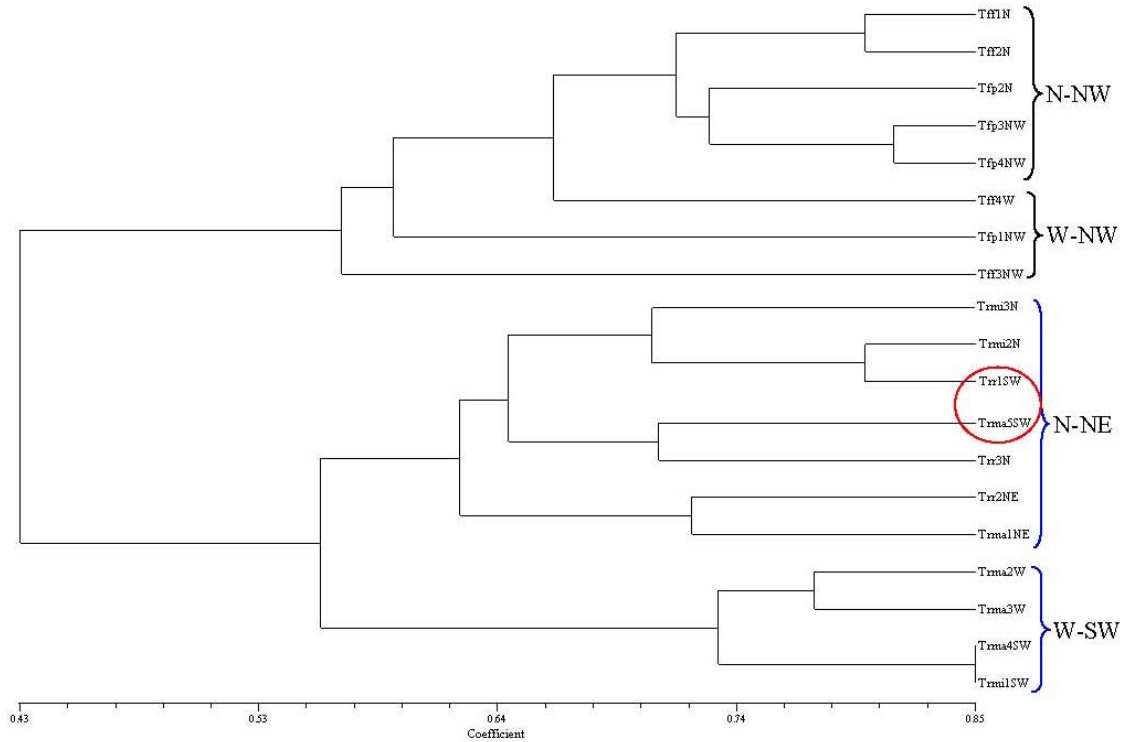
همان طور که دندروگرام (شکل ۴) نشان می‌دهد، گونه *T. fragiferum* از نظر جغرافیایی دو گروه همپوشان را تشکیل داد: خزانه ژنی شمال-شمال غرب و خزانه ژنی غرب-شمال غرب، که این دو خزانه ژنی در ناحیه شمال غرب همپوشانی دارند. به نظر می‌رسد که این گونه از شمال غرب ایران و به احتمال زیاد از کشور ترکیه وارد ایران شده، در دو مسیر متفاوت، به سمت شمال و غرب در امتداد رشته کوه‌های البرز و زاگرس پراکنش یافته است. پراکنش این گونه در امتداد ساحل دریاچه شور ارومیه، مؤید قابلیت بالای این گونه در سازش با محیط‌های پر تنش به ویژه خاک‌های شور و قلیایی است. در گونه *T. resupinatum* دو گروه جغرافیایی مجزا شامل خزانه ژنی شمال-شمال شرق و غرب-جنوب غرب مشاهده شد. این گروه‌بندی، منطبق با پراکنش جغرافیایی ناشی از سازگاری این گونه با محیط است. البته آثاری از نفوذ خزانه ژنی غرب-جنوب غرب در خزانه ژنی شمال-شمال شرق نیز مشاهده می‌گردد که

سایر آغازگرها در هر دو گونه تنوع در خور ملاحظه‌ای نشان دادند. همان طور که در دندروگرام حاصل از تحلیل باندها (شکل ۴) مشاهده می‌شود، در بیشتر موارد، میزان شباهت بین جمعیت‌ها اندک است. با توجه به سیستم زادآوری در این دو گونه که اغلب از نوع خودلقاحی (autogamy) است (Taylor and Gillett, 1988)، انتظار می‌رود که کم بودن جریان ژنی بین جمعیت‌ها سبب افزایش تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها و به همان نسبت کاهش تنوع در درون جمعیت‌ها شود که دندروگرام حاصل از این تحقیق به روشنی این مطلب را نشان داد.

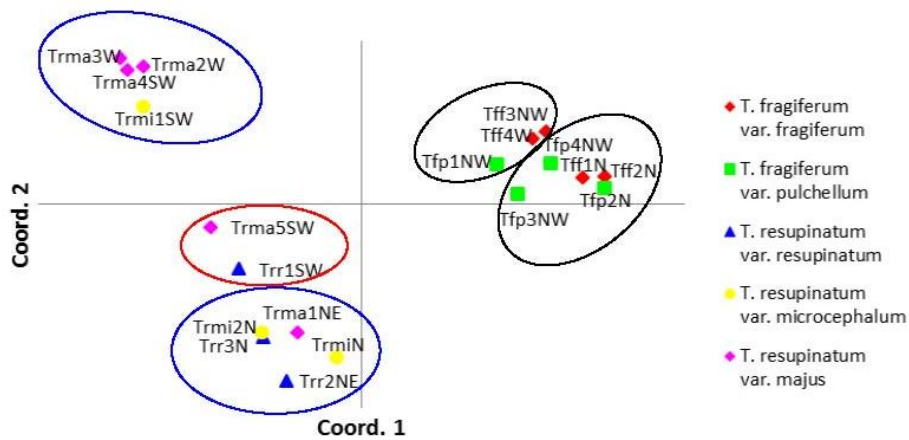
در دندروگرام حاصل از نشانگرهای SSR، دو گونه *T. resupinatum* و *T. fragiferum* در سطح ۴۳ درصد کاملاً از هم جدا شدند و جمعیت‌های مربوط به هر گونه بر روی یک خوشه مجزا قرار گرفتند (شکل ۴) که این گروه‌بندی با طبقه‌بندی تاکسونومیک این گونه‌ها مطابقت دارد (Zohary and Heller, 1984).

دندروگرام حاصل از نشانگرهای SSR سطوح فرگونه‌ای (واریت‌ها) را به وضوح از هم جدا نکرد و این نشان می‌دهد که این نشانگر در جنس *Trifolium* در سطوح فرگونه‌ای کارآیی چندانی ندارد (شکل ۴).

با توجه به فاصله مکانی بین این خزانه‌های ژنی، به احتمال زیاد این اختلاط ناشی از دخالت انسان به واسطه انتقال بذر باشد. این نتایج را در آنالیز مؤلفه‌های اصلی (PCA) نیز به وضوح می‌توان مشاهده کرد (شکل ۵).



شکل ۴- دندروگرام UPGMA بر مبنای میزان شباهت‌های حاصل از تحلیل داده‌های SSR با استفاده از ضریب جاکارد (J) در میان ۱۹ جمعیت از گونه‌های *T. fragiferum* و *T. resupinatum*. N = شمال، NE = شمال شرق، NW = شمال غرب، W = غرب و SW = جنوب غرب. جمعیت‌هایی که توسط دایره احاطه شده‌اند نفوذی‌های خزانه ژنی غرب-جنوب غرب در خزانه ژنی شمال-شمال شرق در گونه *T. resupinatum* هستند.



شکل ۵- رسته‌بندی ۱۹ جمعیت از گونه‌های *T. resupinatum* و *T. fragiferum* بر اساس دو مؤلفه اصلی اول (PCA) بر مبنای میزان شباهت‌های حاصل از تحلیل داده‌های SSR. N = شمال، NE = شمال شرق، NW = شمال غرب، W = غرب و SW = جنوب غرب.

طراحی نشده است، می‌توان با ضریب اطمینان بالایی از آغازگرهای SSR به دست آمده از *T. pratense* و *T. repens* برای بررسی تنوع ژنتیکی آنها استفاده نمود.

از طرفی، به دلیل این که در این پژوهش استخراج DNA ژنومی به صورت جمعیتی انجام گرفت، امکان محاسبه تنوع درون جمعیتی و برون جمعیتی و مقایسه آنها به صورت عددی وجود نداشت. لذا، با توجه به اهمیت این دو گونه زراعی و مرتعی مطالعه دقیق‌تر تنوعات درون و برون جمعیتی در این دو گونه با استفاده از نشانگر SSR و یا سایر نشانگرهای مولکولی پیشنهاد می‌گردد.

نتایج حاصل از این مطالعه، حاکی از سطح بالای چندشکلی و انتقال پذیری ریزماهوره‌های معرفی شده برای *T. pratense* و *T. repens* به گونه‌های *T. fragiferum* و *T. resupinatum* است. بالا بودن انتقال پذیری نشان می‌دهد که این گونه‌ها از نظر ژنتیکی به هم نزدیک هستند و پس از جدایی، ژنوم آنها تغییرات زیادی را متحمل نشده‌اند. بنابراین، می‌توان از نشانگرهای مولکولی SSR مربوط به گونه‌های نزدیک به یکدیگر برای ارزیابی و تحلیل ژنوم در گونه‌های مختلف این جنس استفاده نمود. بر این اساس، تا زمانی که جفت آغازگرهای SSR اختصاصی برای *T. fragiferum* و *T. resupinatum*

منابع

- جود، وی. اس.، کمپبل، سی. اس.، کلوگ، ای. ای. و استیونس، پی. اف. (۱۳۸۲) سیستماتیک گیاهی. ترجمه سعیدی، ح. الف، انتشارات جهاد دانشگاهی، واحد صنعتی اصفهان، اصفهان.
- زمانیان، م. (۱۳۸۴) بررسی اثر فصل کاشت بر تولید علوفه گونه‌های شبدر. نهال و بذر ۲۱: ۱۵۹-۱۷۳.
- عباسی، م. ر. (۱۳۸۷) بررسی تنوع در خزانه‌های ژنتیکی شبدر ایرانی (*T. resupinatum*) موجود در بانک ژن گیاهی ملی ایران. تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران ۱۶(۱): ۳۷-۴۹.
- عباسی، م. ر. و زمانیان، م. (۱۳۸۴) بررسی پتانسیل تولید، صفات مهم در عملکرد و گروه‌بندی ژرم پلاسما شبدرهای ایرانی چند چین. اولین همایش ملی گیاهان علوفه‌ای کشور، کرج.
- نقوی، م.، قره یاضی، ب. و حسینی سالکده، ق. (۱۳۸۴) نشانگرهای مولکولی. انتشارات دانشگاه تهران، تهران.
- Dias, P. M. B., Julier, B. Sampaoux, J. P., Barre, P. and Dall'Agnol, M. (2008) Genetic diversity in red clover (*Trifolium pratense* L.) revealed by morphological and microsatellite (SSR) markers. *Euphytica* 160: 189-205.
- Ellison, N. W., Liston, A., Steiner, J. J., Williams, W. M. and Taylor, N. L. (2006) Molecular phylogenetics of the clover genus (*Trifolium*-Leguminosae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 39: 688-705.
- Fehr, W. R. (1987) Principles of cultivar development. vol. 1. Theory and technique. McGraw Hill, New York.
- Heller, D. (1984) *Trifolium*. In: Flora Iranica. (ed. Rechinger, K. H.) 157: 275-325. Akademische Druck-u., Verlagsanstalt, Graz.
- 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*. *Annales of Forest Science* 56: 259-263.
- Sato, S., Isobe, S., Asamizu, E., Ohmido, N., Nakamura, Y., Kaneko, T., Sakurai, N., Okumura, K., Klimenko, I., Sasamoto, S., Wada, T., Watanabe, A., Kohara, M., Fujishiro, T. and Tabata S. (2005) Comprehensive structural analysis of the genome of red clover (*Trifolium pratense* L.). *DNA Research* 12: 301-364.
- Taylor, N. L. (1985) *Clover science and technology*. Madison, Wisconsin.
- 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.
- Zhang, X., Zhang, Y., Yan R., Han, J., Hong, F., Wang, J. and Cao, K. (2010) Genetic variation of white clover (*Trifolium repens* L.) collections from China detected by morphological traits, RAPD and SSR. *African Journal of Biotechnology* 9(21): 3032-3041.
- Zhang, Y., Sledge, M. K. and Bouton, J. H. (2007) Genome mapping of white clover (*Trifolium repens* L.) and comparative analysis within the Trifolieae using cross-species SSR markers. *Theor Appl Genet.* 114: 1367–1378.
- Zohary, M. and Heller, D. (1984) *The genus Trifolium*. The Israel Academy of Science, Jerusalem.

**Phenetic analysis of *Trifolium resupinatum* L. (Persian clover)
and *Trifolium fragiferum* L. (strawberry clover)
using new microsatellite loci**

Maryam Haerinasab¹ * and Peyman Agahei²

¹ Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran

² Department of Biology, Payame Noor University, 19395-4697 Tehran, I. R. of Iran

Abstract

Trifolium resupinatum and *T. fragiferum* are two important crop species among the legumes. *T. fragiferum* is considered as one of the gene pools of *T. resupinatum*. In this study, the transferability of SSR markers from *T. pratense* and *T. repens* to genotypes of these two species was evaluated and new microsatellite loci for these species were obtained. Their genomic similarity was studied using the SSR markers and phenetic analysis. The results of this study indicated a high level of transferability and polymorphism for microsatellites from *T. pratense* and *T. repens* to genotype of *T. resupinatum* and *T. fragiferum*. Studies also showed that the genetic diversity was high among the populations and the studied populations were grouped in the low levels of similarity. Also, *T. resupinatum* and *T. fragiferum* were grouped in clusters with very low similarity that indicated genomic differences between them in tested SSR loci. This study showed that microsatellites can be useful tools to evaluate genetic variation in these species. The results suggested that as long as specific SSR primers for these two species were not designed, SSR primers of *T. pratense* and *T. repens* could be used with high reliability for genomic analysis of these species.

Key words: *Trifolium resupinatum*, *T. fragiferum*, SSR, Phenetic analysis, Iran

* m.haerinasab@gmail.com