

شناسایی گونه‌های جنس شبدر (بخش *Chronosemium*) در ایران
با استفاده از خصوصیات دانه

فهیمة سلیم‌پور^۱، شادی حاج‌رسولی‌ها^۱، فریبا شریف‌نیا^۱

چکیده

Chronosemium یکی از بخش‌های جنس شبدر می‌باشد که دارای ۵ گونه‌ی علفی یک‌ساله (*T.campestre*، *T.aureum*) و یک‌گونه‌ی علفی چندساله (*T.spadiceum*، *T.micranthum*، *T.grandiflorum*) در ایران می‌باشد. دو گونه‌ی *T.campestre* و *T.aureum* دارای شباهت‌های ریخت‌شناسی بسیار به ویژه در شکل درفش گل، طول دندانه‌های کاسه و رنگ جام گل می‌باشند و همچنین دو گونه‌ی *T.spadiceum* و *T.badium* در صفتهایی مانند شکل درفش و رنگ جام گل دارای تشابه بالایی هستند، به طوری که مطالعه‌های ریخت‌شناسی به تنهایی قادر به تفکیک و شناسایی آن‌ها نمی‌باشد. با استفاده از میکروسکوپ الکترونی (S.E.M) اطلاعات مربوط به سه دانه از هرگونه مورد بررسی قرار گرفت و صفتهایی مانند شکل دانه، رنگ دانه، تزیینات سطح دانه، طول دانه (L)، عرض دانه (W)، نسبت و شکل ناف در نظر گرفته شد. بیش‌ترین طول دانه مربوط به گونه‌ی *T.badium* و کم‌ترین طول دانه مربوط به گونه‌ی *T.aureum* می‌باشد؛ همچنین بیش‌ترین عرض دانه در گونه‌ی *T.badium* و کم‌ترین آن در گونه‌ی *T.aureum* مشاهده شد. تزیینات سطح دانه در گونه‌های این بخش از غده‌ای (tuberculate) تا چروکیده (rugulate) و رنگ دانه بین زرد تا قهوه‌ای متغیر می‌باشد. با تجزیه خوشه‌ای (کلاستر)، PCA و FA صفتهای مربوط به دانه، قرابت فنتیکی گونه‌ها مطالعه شد و در پایان کلید شناسایی مربوط به گونه‌های این بخش بر اساس صفات مربوط به دانه ارائه شد.

کلمه‌های کلیدی: دانه - بخش *Chronosemium* - شبدر - ایران.

- استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال.
تاریخ دریافت: زمستان، تاریخ پذیرش: تابستان^۱

جنس شبدر یا *Trifolium* یکی از مهم‌ترین جنس‌های مربوط به تیره *Fabaceae* است که ارزش زراعی و علوفه‌ای فراوان دارد. این جنس در نواحی معتدله و نیمه‌گرمسیر جهان گسترش دارد. همچنین با فراوانی کم‌تر در نواحی گرمسیری (استوایی) غرب آفریقا و جنوب آمریکا بیش‌تر در نوارهای کوهستانی و آلپی یافت می‌شود. بیش‌ترین پراکنش این جنس در ایران مربوط به نواحی شمال و غرب کشور می‌باشد.

جنس *Trifolium* مشتمل بر ۲۵۰ گونه‌ی علفی یک‌ساله و چندساله در قالب ۸ بخش (*Involucrarium*، *Trifolium*) از مراکز تنوع این جنس با ۵۲ گونه‌ی علفی یک‌ساله و چندساله در ۶ بخش از ۸ بخش موجود در دنیا می‌باشد به طوری که دو بخش *Invulcrarium* و *Paramesus* در ایران پراکنش ندارند (Zohary & All, 1984).

بر طبق آخرین تحقیق‌های انجام شده بر روی جنس شبدر توسط Ellison & All (۲۰۰۶)، رده‌بندی جدیدی برای بخش‌های این جنس ارائه شده است که در جدول ۱ نشان داده شده است (Ellison & All, 2006).

Chronosemium یکی از بخش‌های جنس شبدر می‌باشد که دارای ۵ گونه‌ی علفی یک‌ساله (*T.campestre*، *T.aureum*)، *T.spadiceum*، *T.micranthum*، *T.grandiflorum* و یک گونه‌ی علفی چندساله *T.badium* می‌باشد. بین گونه‌های یک‌ساله *T.campestre* و *T.aureum* تشابه ریختی بالایی به ویژه از نظر خصوصیت‌های اندام‌های زایشی دیده می‌شود که شناسایی و رده‌بندی آن‌ها را با مشکل مواجه ساخته است. همچنین گونه‌ی *T.badium* دارای ویژگی‌های ریختی نزدیکی با گونه‌ی *T.spadiceum* است.

دانه‌های جنس شبدر از نظر ابعاد، وزن و شکل متفاوت با یکدیگر هستند. آن‌ها بیش‌تر به اشکال تخم‌مرغی، بیضوی یا واژ تخم‌مرغی بیضوی می‌باشند (Watson & All, 2000).

از سوی دیگر، استفاده از خصوصیت‌های میکرومورفولوژی دانه *Seminology* می‌تواند در مطالعه‌های تاکسونومی گیاهی مفید باشد (آقایی، ۱۳۷۱).

بر این اساس Zohary & Heller (۱۹۸۴) در یک مطالعه جامع، دانه‌های چندین گونه از جنس شبدر را از نظر تزیینات سطح دانه بررسی کردند. بیش‌تر گونه‌های بررسی شده مربوط به بخش *Lotoidea* و یا بخش‌های مربوط به دنیای جدید می‌باشند. در این مطالعه ۵ نوع متفاوت از تزیینات سطح دانه بررسی شده است (Zohary & All, 1984). همچنین Karamian & Ranjbar (۲۰۰۵) به بررسی مورفولوژی دانه جنس‌هایی از تیره *Fabaceae* پرداخته‌اند و نشان داده‌اند که خصوصیت‌های ریخت‌شناسی دانه نقش مهمی در مطالعه‌های تاکسونومی در این تیره دارد (Karamian & All, 2005). سلیم‌پور و مصطفوی در سال ۲۰۰۷ به مطالعه ریخت‌شناسی دانه‌ی گونه‌های بخش *Lotoidea* موجود در ایران پرداختند و گونه‌های نزدیک به هم شامل

T. repens و *T. nigrescens* و نیز *T. montanum* و *T. ambigum* را با استفاده از خصوصیت‌های ریخت‌شناسی دانه تفکیک کرده‌اند (Salimpour & Ali, 2007).

در این پژوهش ویژگی‌های میکرومورفولوژیکی دانه‌ی مربوط به گونه‌های بخش *Chronosemium* در ایران برای مطالعه‌ی قرابت فنیتیکی گونه‌ها با یکدیگر مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

گونه‌های بخش *Chronosemium* با همکاری مؤسسه اصلاح و تهیه نهال و دانه گرج (بانک ژن)، مؤسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی و هر بارپوم دانشکده ارومیه و دانشکده کشاورزی گرج جمع‌آوری شد و از هر گونه ۳ دانه مورد مطالعه قرار گرفت (جدول ۲).

برای بررسی میکرومورفولوژیکی دانه‌ی گونه‌های این بخش از میکروسکوپ الکترونی (S.E.M) استفاده شد. دانه‌ها توسط ورقه نازکی از پلاتین یا طلا پوشانده شده و عکس‌هایی از نمای کلی و تزئینات سطح دانه تهیه شد (شکل‌های ۱ و ۲). صفاتی چون شکل دانه، رنگ دانه، تزئینات سطح دانه، طول دانه (L)، عرض دانه (W) نسبت و شکل ناف بررسی شد (جدول ۳). با استفاده از نرم‌افزار NTSYS تجزیه آماری بر اساس داده‌های به‌دست آمده از اندازه‌گیری صفات کیفی و کمی انجام شد و برای معلوم کردن متغیرترین عامل‌ها در تنوع، تجزیه به عامل‌ها (FA) انجام گرفت و نیز تجزیه‌ی خوشه‌ای کلاستر به روش Ward و تجزیه به مؤلفه‌های اصلی اول و دوم (PCA) برای معلوم کردن نزدیکی فنیتیکی گونه‌ها انجام شد (حاج‌رسولیا، ۱۳۸۵).

نتایج

در این بررسی میانگین اطلاعات کمی همراه با صفت‌های کیفی مربوط به ۳ دانه از هر گونه در جدول ۳ آورده شده است. مطالعه بر روی دانه‌ی گونه‌های بخش *Chronosemium* نشان می‌دهد که طول دانه بین ۰/۹۸ mm تا ۱/۷۴ mm و عرض آن بین ۰/۵۹ mm تا ۱/۲۵ mm متغیر می‌باشد.

بیش‌ترین طول دانه مربوط به گونه‌ی *T. badius* و برابر با ۱/۷۴ mm و کم‌ترین آن مربوط به *T. aureum* و برابر ۰/۹۸ mm است. شکل ناف (Hill) در گونه‌های این بخش متفاوت است و به شکل‌های مربع شکل، تخم‌مرغی پهن نوک‌دار، گروی و تخم‌مرغی دیده می‌شود (شکل ۳). رنگ دانه یک صفت کیفی دیگر می‌باشد که در بین گونه‌های این بخش از زرد تا قهوه‌ای متغیر است. شکل دانه در گونه‌های این بخش تنوع زیادی نشان می‌دهد و به شکل‌های بیضوی، واژ تخم‌مرغی، واژ تخم‌مرغی بیضوی، تخم‌مرغی و تخم‌مرغی کلیوی دیده می‌شود (شکل ۱).

تزیینات سطح دانه نیز در گونه‌های این بخش به شکل‌های مختلف دیده می‌شود و در هیچ کدام از گونه‌ها با یکدیگر تشابه ندارد (شکل ۲). براساس صفت‌هایی که در بالا آمد آنالیز کلاستر به روش Ward برای گونه‌های این بخش انجام شد و داندروگرام به دست آمده از آن‌ها ترسیم شد (نمودار ۱).

طبق آنالیز کلاستر به روش Ward گونه‌های بخش *Chronosemium* را می‌توان به دو خوشه‌ی اصلی تقسیم کرد. خوشه‌ی اصلی اول شامل گونه‌های *T.aureum*، *T.campestre* و *T.micranthum* و خوشه‌ی اصلی دوم شامل گونه‌های *T.badium*، *T.spadiceum* و *T.grandiflorum* می‌باشد.

خوشه‌ی اصلی اول خود به ۲ زیر خوشه‌ی تقسیم شده که در زیر خوشه‌ی اول دو گونه‌ی *T.aureum* و *T.campestre* با ضریب همبستگی بالا (نزدیک به ۱) کنار هم قرار دارند. در زیر خوشه‌ی دوم گونه‌ی *T.micranthum* به تنهایی و با فاصله زیاد از دو گونه‌ی بالا قرار گرفته است. در خوشه‌ی اصلی دوم دو گونه‌ی *T.badium* و *T.spadiceum* با ضریب همبستگی کم‌تر و با فاصله زیاد در کنار هم قرار گرفته‌اند.

با استفاده از مؤلفه‌ی اصلی اول و دوم آرایش فضایی گونه‌های این بخش به روش PCA ترسیم شد که نتیجه به دست آمده از آنالیز Ward را تأیید می‌کند (نمودار ۲).

در تجزیه عامل‌ها (FA) دو مؤلفه‌ی اصلی اول (با واریانس ۳۹/۸۳) و مؤلفه‌ی اصلی دوم (با واریانس ۲۷/۳۵) سهم مهمی در تفاوت و تشابه گونه‌ها دارند که این مؤلفه‌ها خود مجموعه‌ای از صفات کیفی و کمی مربوط به دانه در نظر گرفته شده است. در مؤلفه اصلی اول صفت طول دانه با واریانس ۰/۹۵۸ و صفت نسبی طول به عرض دانه یا L/W با واریانس ۰/۵۲۳ بعد از آن قرار دارد. در مؤلفه اصلی دوم صفت شکل دانه با واریانس ۰/۹۵۵ در مرتبه‌ی اول و صفت رنگ دانه با واریانس ۰/۸۵۳ در مرتبه‌ی دوم قرار دارد (جدول‌های ۴ و ۵).

بحث

براساس نتیجه‌ی به دست آمده، گونه‌های یک‌ساله *T. aureum* و *T. campestre* که دارای تشابه بالایی ریخت‌شناسی با یکدیگر می‌باشند توسط صفات میکرو مورفولوژیکی دانه از یکدیگر تفکیک نشدند. Liliana & All (۲۰۰۶) روی ویژگی‌های ژنتیکی و توالی‌های ITS در rDNA ۳۱ گونه از جنس شیدر مطالعه کردند که در این تحقیق ۳ گونه‌ی *T.aureum*، *T.badium* و *T.campestre* از بخش *Chronosemium* انتخاب شده است. آن‌ها براساس تحقیق انجام شده توانستند دو گونه‌ی *T.aureum* و *T.campestre* را که دارای تشابه مورفولوژیکی بالایی به یکدیگر هستند از یکدیگر جدا کنند که این نتیجه‌ها را تأیید نمی‌کند (Liliana & All, 2006).

Watson & All (۲۰۰۰) در مطالعه‌ی گونه‌های جنس شبدر با استفاده از مارکرمولکولی ITS نیز نشان داده‌اند که *T. badium* دارای نزدیکی زیادی با گونه‌ی *T. grandiflorum* است که نتیجه‌ی آن با آنالیز خوشه‌ای مربوط به دانه برابری نشان می‌دهد. در این پژوهش گونه‌ی *T. grandiflorum* که از نظر ویژگی‌های ریختی به ویژه ساختار گل با گونه‌ی *T. badium* متفاوت است در یک خوشه ولی با فاصله زیاد در خط فنولاین ۱-۵ قرار گرفته‌اند (Watson & All, 2000).

بر طبق تحقیق‌های Ellison & All (۲۰۰۶) بخش *Chronosemium* از سطح بخش به زیر جنس تبدیل شده است و بررسی‌های مولکولی مؤید آن است که این زیر جنس (بخش *Chronosemium*) نسبت به تمامی گونه‌های دیگر جنس شبدر (زیر جنس *Trifolium*) از نظر توالی ژن‌های کلروپلاستی، ژن‌های rDNA گروهی همگن و یکنواخت را تشکیل داده است (Ellison & All, 2006).

بر اساس همه‌ی نتیجه‌های به دست آمده در این بررسی کلید شناسایی مصنوعی بر اساس خصوصیت‌های دانه برای گونه‌های بخش *Chronosemium* ارائه شده است:

	تزیینات سطح دانه صاف	1a
2	-
	
<i>T.campestre</i>	ناف تخم‌مرغی، طول × عرض دانه ۱×۰/۶۳ mm	1b
	-
<i>T. aureum</i>	ناف مربع شکل، طول × عرض دانه ۰/۹۸×۰/۵۹ mm	2a
	-
	تزیینات سطح دانه چروکیده	b
3	2
	-
<i>T.badium</i>	تزیینات از نوع چروکیده منظم، شکل دانه واژ تخم‌مرغی	a
	3
	-
	تزیینات از نوع چروکیده نامنظم، شکل دانه تخم‌مرغی یا تخم‌مرغی کلیوی	b
4	3
	-
	سطح دانه بدون غده، ناف کروی یا تخم‌مرغی پهن نوکدار	a
5	4
	-
<i>T.spadiceum</i>	سطح دانه غده‌ای، ناف مربع شکل	b
	4
	-

T.micranthu m	طول دانه کمتر از 1 mm، رنگ دانه قهوه‌ای	۵a	-
		
T.grandifloru m	طول دانه بیش‌تر از 1 mm، رنگ دانه زرد	۵b	-
		

جدول ۱- جدیدترین رده‌بندی ارائه شده برای جنس شبدر (*Trifolium*)

زیر جنس: Subgenus	<i>Chronosemium</i>
زیر جنس: Subgenus	<i>Trifolium</i>
بخش: Section	<i>Paramesus</i>
بخش: Section	<i>Trichocephalum</i>
بخش: Section	<i>Trifoliastrum</i>
بخش: Section	<i>Involucrarium</i>
بخش: Section	<i>Vesicastrum</i>
بخش: Section	<i>Glycyrrhizum</i>
بخش: Section	<i>Lupinaster</i>
بخش: Section	<i>Trifolium</i>

جدول ۴- گونه‌های مورد مطالعه شبدر *Trifolium* بخش *Chronosemium* و رویشگاه آن‌ها

نام گونه	رویشگاه	ارتفاع	جمع آوری کننده	کد نمونه
<i>Trifolium aureum</i> Poll.	آذربایجان ، سراب ، امیر جد به طرف سیلان	۳۰۰۰	رجامند	۵۶۳۰
<i>Trifolium badium</i> Schreb.	تهران ، دیزین	۲۸۰۰	زرقانی	۲۸۳۵۷
<i>Trifolium campestre</i> Schreb.	گیلان- انزلی بائلاق بوشمن	۰	ایران شهر	۳۷۵۵۵
<i>Trifolium grandiflorum</i> Schreb.	کرمانشاه- گیلان غرب- کاسه گران	۷۰۰	ایران شهر	۳۷۵۴۵
<i>Trifolium micranthum</i> Viv.	رشت	۸۰	ایران شهر	۳۷۵۴۳
<i>Trifolium spadiceum</i> L.	آذربایجان- سراب امیر جد به طرف سیلان	۳۰۰۰	ایزدیار	۱۴۶۴۴

جدول ۳ ویژگی‌های دانه مورد مطالعه گونه‌های جنس *Trifolium* بخش *Chronosemium*

شکل دانه	رنگ دانه	تزیینات سطح دانه	طول دانه (L)mm	عرض دانه (W)mm	نسبت طول به عرض $\frac{L}{W}$	شکل ناف	صفت گونه
بیضوی	زرد	غده‌ای صاف	۰/۹۸	۰/۵۹	۱/۶۶	مربع شکل	<i>Trifolium aureum</i> poll.
واژتخم‌مرغی	قهوه‌ای	چروکیده	۱/۷۴	۱/۲۵	۱/۳۹	تخم‌مرغی پهن نوکدار	<i>Trifolium badium</i> Schreb.
بیضوی	زرد	صاف	۱	۰/۶۳	۱/۵۸	تخم‌مرغی	<i>Trifolium campestre</i> Schreb.
تخم‌مرغی	زرد	چروکیده	۱/۶۳	۰/۹۲	۱/۷۷	تخم‌مرغی پهن نوکدار	<i>Trifolium grandiflorum</i> Schreb.
تخم‌مرغی کلیوی	قهوه‌ای	چروکیده نامنظم برجسته	۰/۹	۰/۷	۱/۲۸	گروی یا مدور	<i>Trifolium micranthum</i> Viv.
تخم‌مرغی	زرد	چروکیده نامنظم غده‌ای	۱/۳	۱/۲۲	۱/۰۶	مربع شکل	<i>Trifolium spadiceum</i> L.

جدول ۴ تجزیه عامل‌ها (واریانس مؤلفه اصلی اول و دوم) بر اساس صفت‌های مربوط به دانه

در گونه‌های جنس *Trifolium* بخش *Chronosemium*

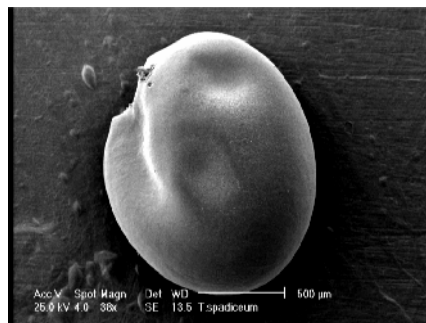
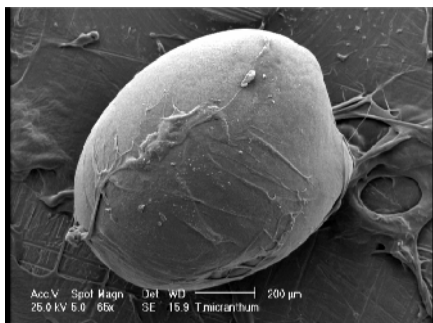
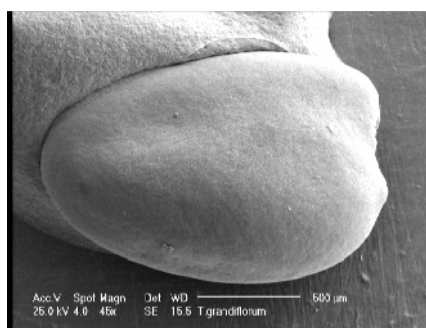
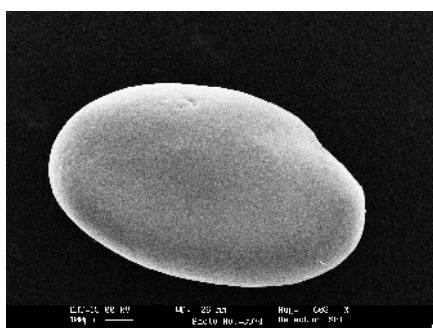
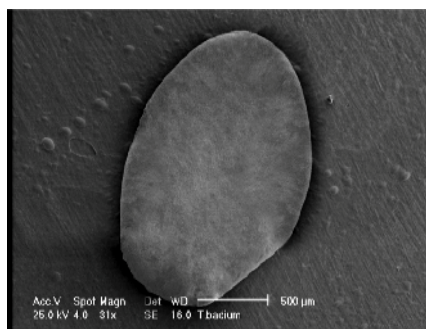
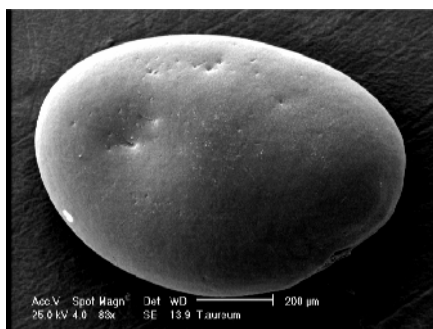
Component	Initial Eigenvalues			Rotation sums of Squared Loadings		
	Total	Variance of %	Cumulative %	Total	Variance of %	Cumulative %
۱	۲/۷۹۸	۳۹/۸۳۷	۳۹/۸۳۷	۲/۲۳۲	۳۱/۸۸۵	۳۱/۸۸۵
۲	۱/۹۱۴	۲۷/۳۵۰	۶۷/۱۸۷	۱/۹۸۵	۲۸/۳۵۸	۶۰/۲۴۳
۳	۱/۲۴۳	۱۷/۷۵۳	۸۴/۹۴۰	۱/۷۲۹	۲۴/۶۹۷	۸۴/۹۴۰
۴	۰/۹۰۸	۱۲/۹۶۵	۹۷/۹۰۵			
۵	۰/۱۴۷	۲/۰۹۵	۱۰۰/۰۰۰			
۶	۳/۵۳۴E ۱۶	۵/۰۸۴E ۱۵	۱۰۰/۰۰۰			
۷	۴/۶۰E ۱۷	۴/۷۲E ۱۶	۱۰۰/۰۰۰			

جدول ۵ تجزیه عامل‌ها بر اساس مهم‌ترین صفت‌های مربوط به دانه همراه با درصد واریانس

در گونه‌های جنس *Chronosemium*

مؤلفه	درصد واریانس	صفات
۱	۳۹/۸۳۷	طول دانه ، نسبت طول به عرض دانه L/W

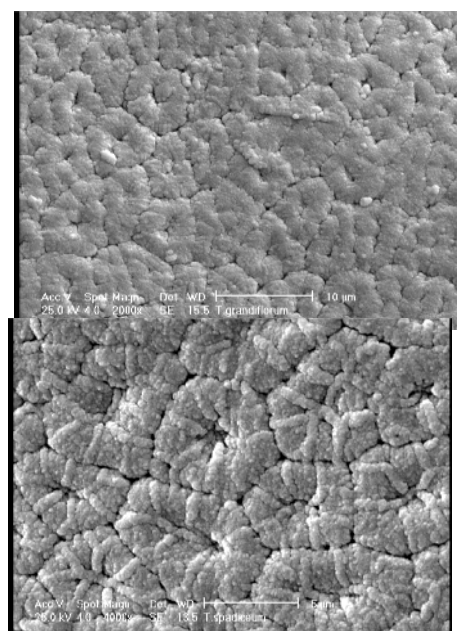
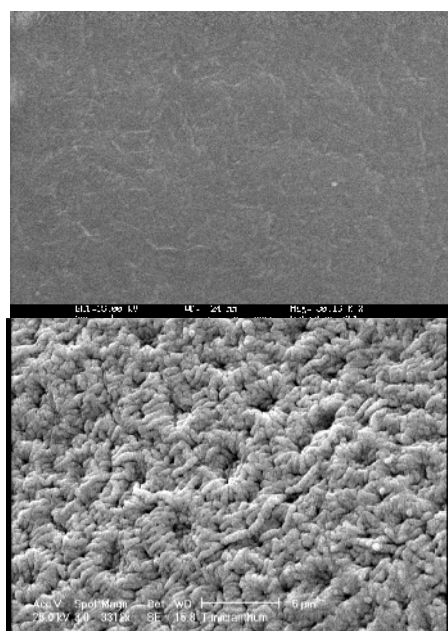
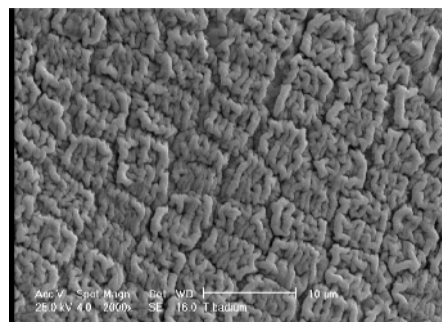
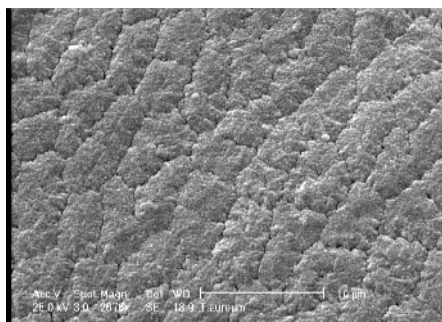
شکل دانه ، رنگ دانه	۲۷/۳۵	۲
---------------------	-------	---



a) *Trifolium aureum* (83x)
c) *Trifolium campestre* (130x)
e) *Trifolium micranthum* (65x)

b) *Trifolium badium* (31x)
d) *Trifolium grandiflorum*
f) *Trifolium spadiceum* (38x)

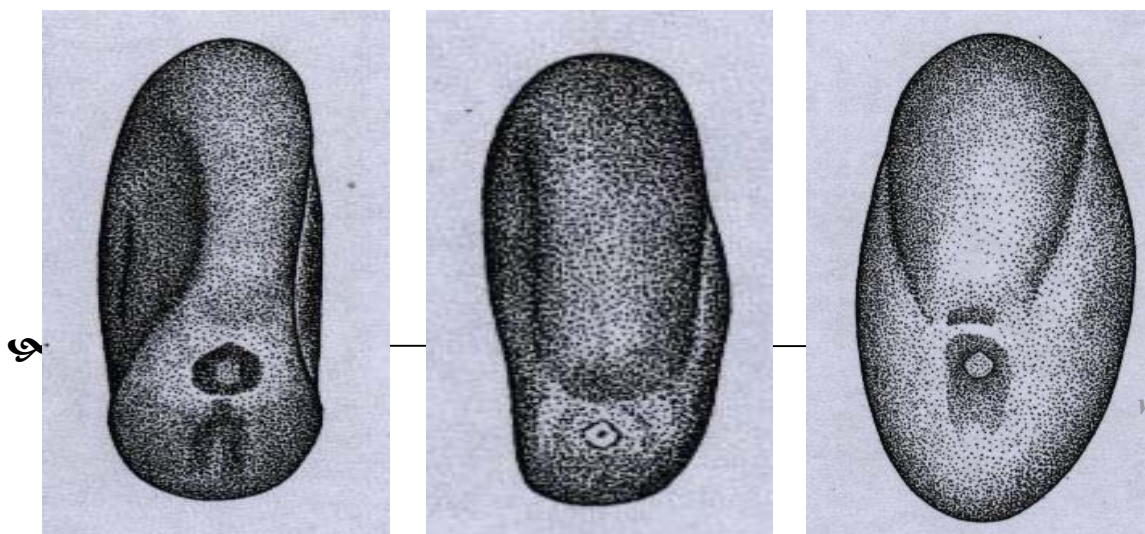
شکل ۱- مقایسه نمای کلی دانه گونه‌های جنس *Trifolium* بخش *Chronosemium*



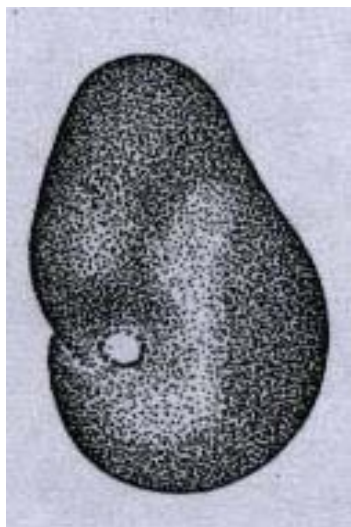
c) *Trifolium campestre*(6500x)
e) *Trifolium micranthum* (3312x)

d) *Trifolium grandiflorum*(2000x)
f) *Trifolium spadiceum* (4000x)

شکل ۴ مقایسه تزیینات سطح دانه گونه‌های جنس *Trifolium* بخش *Chronosemium*

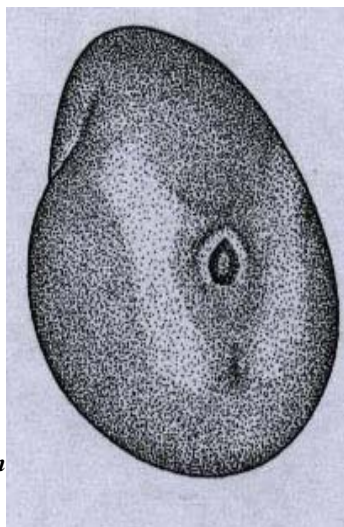


Trifolium badium



ron

Trifolium aureum

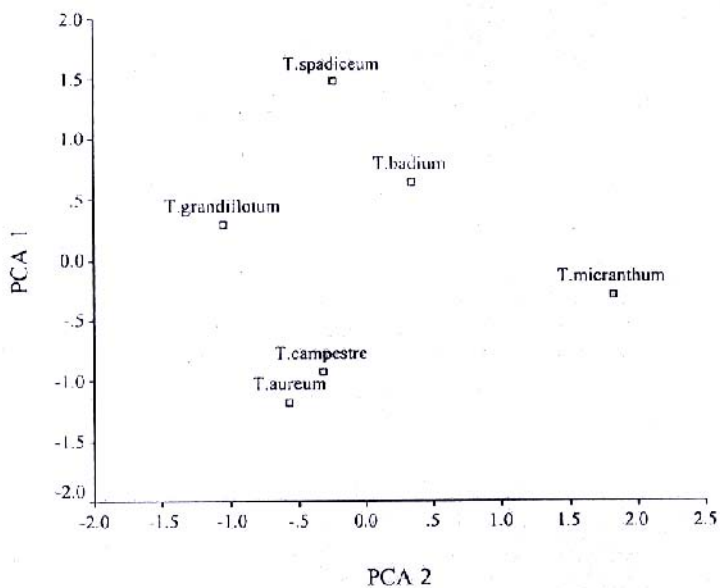
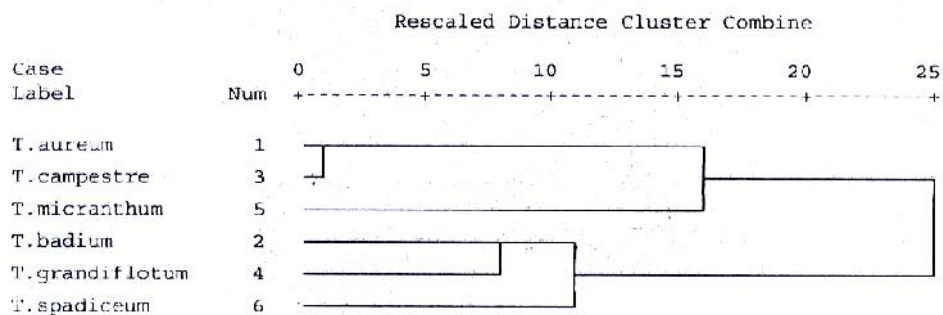


(Hi

Trifolium spadiceum



Dendrogram using Ward Method



نمودار ۴ تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA) بر اساس صفت‌های مربوط به دانه
گونه‌های جنس *Trifolium* بخش *Chronosemium*

منابع

- آقا بیگی، ف. ۱۳۷۱. کلید شناسایی دانه علف‌های هرز منطقه کرج. انتشارات مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع.
- حاجرسولیه‌ها، ش. ۱۳۸۵. مطالعه بیوسیتماژیک گونه‌های جنس شبدر بخشی *Chronosemium* در ایران، پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال.
- Ellison, W. Nick; liston, A. Steine, J. Williams, M. Taylor, L. 2006; Molecular Phylogenetics of the clover genus (*Trifolium –Leguminosae*), Molecular Phylogenetics and Evolution . 688-705.
- Karamian, R. Ranjbar, M. 2005 , *Astragalus* Sect. *Astragalus* (*Fabaceae*) in Iran , 147:363-388.
- Liliana, V. Branka, J. Borut, B. 2006, Genetic Characterization of Selected *Trifolium* species as revealed by nuclear DNA content and ITS rDNA region analysis plant science 859-866.
- Salimpour, F. Mostafavi, G. Sharifnia, F. 2007, Micromorphologic study of the seed of the Genus *Trifolium* , Section *Lotoidea* in Iran , Pakistan Journal of Biological Science 10(3) : 378-382.
- Watson, L.E. Sayed-Ahmed, Hand Badr, A. 2000; Molecular Phylogeny of old world based on plastid and nuclear markers plant systematic and Evolution 224:153-171.
- Zohary, M. and Heller, D. 1984; the genus *Trifolium* Israel Academy of science and humanities 2:145-171.

