تاکسونومی و بیوسیستماتیک، سال پنجم، شماره چهاردهم، بهار ۱۳۹۲، صفحه ۴۱-۵۲
دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۱۱/۱۸ پذیرش نهایی: ۱۳۹۰/۱۲/۲۱

بررسی تاکسونومی عددی *Trifolium resupinatum* L. (شبدر ایرانی) و *Trifolium fragiferum* L. (شبدر توت‌فرنگی) با استفاده از ریزماهواره‌های 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 باقلائیان 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 (ریزماهواره‌های) 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 ریزماهواره‌های 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 ریزماهواره‌ها 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: شبدر ایرانی (*Trifolium resupinatum*)، شبدر توت‌فرنگی (*T. fragiferum*)، SSR، تحلیل تاکسونومی عددی، ایران

مقدمه

جنس شبدر (*Trifolium* L.) متعلق به طایفه Trifolieae Brongniart از تیره باقلائیان (Fabaceae 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

* m.haerinasab@gmail.com

Archive of SID
www.SID.ir

نزدیکی با جنس‌های *Trigonella* L.، *Medicago* 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*) مهم ترین 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 لاکی) و *T. hybridum* L. (شبدر دو رگ) هستند (Taylor, 1985)، در حالی که در ایران مهم ترین 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، 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 کُرک 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 رگ‌گیری 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، جنوب‌غرب و مرکز ایران پراکنده است (Heller, 1984).

ریزماهواره‌ها 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 هم‌بارز 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

Archive of SID

www.SID.ir

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؛ Dias *et al*., 2008؛ Zhang *et al*., 2007؛ Zhang, 2010. Sato و همکاران (۲۰۰۵) و Zhang و همکاران (۲۰۰۷) با استفاده از نشانگرهای SSR به ترتیب نقشه ژنتیکی *T. pratense* و *T. repens* 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 گونه های *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 گونه های خویشاوند در این گونه ها 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 دوگونه ارزیابی شد و ریزماهواره‌های تکثیر شده به عنوان ریزماهواره‌های 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 گونه ها 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 Lambda III (λ3) 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 ریزماهواره‌ها 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.

Archive of SID

www.SID.ir

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

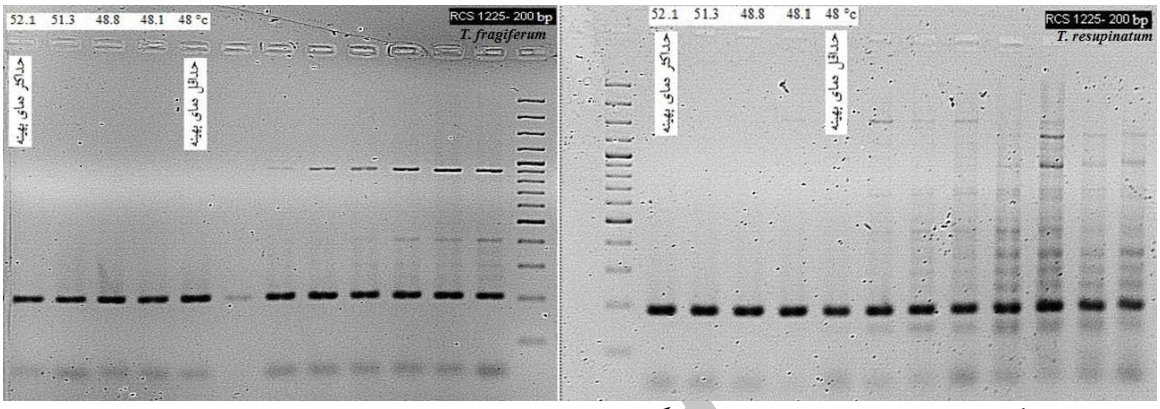
تاکسون	کد تاکسون	شماره هرباریومی	تاریخ جمع‌آوری	ارتفاع از سطح دریا (متر)	محل جمع‌آوری
T. fragiferum var. *fragiferum*	Tff1	17836 HUI	۱۳۸۹/۰۴/۳۱	۲۱۰۸	تهران: فیروزکوه به پلور، ارجمند
	Tff2	17835 HUI	۱۳۸۸/۰۵/۲۹	۰	گلستان : گلوگاه به گرگان، روستای النگ
	Tff3	17838 HUI	۱۳۸۸/۰۵/۱۴	۱۲۵۰	آذربایجان غربی: ۲۰ کیلومتری اهر به مشکین شهر، روستای نقاره کوب
	Tff 4	17847 HUI	۱۳۸۸/۰۵/۰۱	۱۹۲۹	لرستان: شول آباد
T. fragiferum var. *pulchellum*	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
T. resupinatum var. *resupinatum*	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 جوکلبندان
T. resupinatum var. *microcephalum*	Trmi1	17893 HUI	۱۳۸۸/۰۲/۲۵	۹۴	خوزستان: ۲۰ کیلومتری جاده اندیمشک به شوش
	Trmi2	17892 HUI	۱۳۸۸/۰۳/۱۱	۳۳۰	مازندران: زیرآب به فیروزکوه، ۴ کیلومتری زیرآب
	Trmi3	17894 HUI	۱۳۸۹/۰۳/۲۵	۴۳	گیلان: رضوانشهر
T. resupinatum var. *majus*	Trma5	17903 HUI	۱۳۸۸/۰۲/۲۷	۸۲۸	خوزستان: کیلومتر ۵ 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

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 جداگانه توسط PCR گرادیان تعیین شد و سپس با بررسی محصول PCR بهترین غلظت و مناسب‌ترین دما انتخاب گردید. محدوده گرادیان دمایی حداکثر بین ۸± درجه سانتیگراد پایین‌ترین دمای ذوب توصیه شده برای هر زوج آغازگر در نظر گرفته شد. برای هر زوج آغازگر یک محدوده دمایی بهینه از حداقل تا حداکثر

Archive of SID

www.SID.ir

دمـای بهینـه تعیـین گردیـد (شـکل ۱)، بـه طـوری کـه دربردارنده دمای بهینـه اتصـال بـرای هـر دو گونـه باشـد. بنابراین، فرآیند PCR برای هر دو گونه به طـور هـم‌زمـان انجـام شـد. از ۲۲ زوج آغـازگر SSR اسـتفاده شـده، ۱۳ زوج از آنهـا دارای محصـول PCR مشـخص و منفـرد نبودنـد و یـا نتوانسـتند قطعـات DNA را تکثیـر کننـد. بـه همـین دلیـل نشـدند (جـدول ۲). ۹ زوج آغـازگر کـه در PCR گرادیـان دارای محصـول PCR مشـخص بودنـد انتخاب و فرآیند PCR پس از تعیین دمـای مناسـب بـرای آنها انجام شد.



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 گونـه‌هـای *T. fragiferum* و *T. resupinatum*. * آغازگرهـایی که توانستند در این مطالعه ریزماهواره‌های مورد نظر را تکثیر کنند.

نام آغازگر	ردیف قطعه تکراری (motif)	توالی آغازگر پیرو (′۳ → ′۵) (reverse primer)	توالی آغازگر پیشرو (′۳ → ′۵) (forward primer)
RCS0883 *	AAG	GAAGAGATAGCTTGCCTTGGA	CACGTTACTCAATTTGGATCTTTG
RCS0907	AAC	TGGGGAAGTGAAGGATGTTC	ATTTGAGCACAAGGCCTCAC
RCS1479	AG	ATCAACTCGATGGGAACACC	TTTTCTGGCGACGAATTAGG
RCS2773	AAG	GATTTCGATCCTCCTCCTCC	AATAACAATATGCGGCTTTGC
RCS0033	AAT	GCAGATTATGAGGAATAACATTG	AAATTATCATTTTGCAAATTTTA
RCS2343	AC	TTCAATCGGGAGTGTCAGTG	CGATTGCTACAAACACAGCC
RCS1735 *	AAC	GGTGCTAGCTCCAACCTCAG	CCTGCTCCGTACCATTGTTT
RCS2667 *	AAG	GGTGGTGTTGCTGATTACGA	CCTCAGCAGAATCTTCACCC
RCS1920*	AAG	CCCCCAAAATACAAAACCCT	GAGAAAAGAAAGAAGTCTCTGAAGGA
RCS1928 *	AGC	CCTTTCAGAACAGATGGCGT	TACCCTCTTGAGCACCCATT
RCS2202 *	AC	CGGCAGACGAAGTGACAAAT	GCCGATATTGCTAGGTTGGA
RCS1225 *	ATC	CTCGCTGAAGGAGGAAACAG	TGCAAACTCCGCTTTATGC
RCS1737	ATC	AGCTCAAGCTCAACGGACAT	GGCACGAGGCACACTACTTC
RCS1518	ATC	CGAAGCAGGTTGGAAAACAT	GCACGAGGCACACACTACTT
RCS0843	GGAT	TTGGCATCTCAAAGCTGAAA	GCCAAGCCCACCAATACATA
RCS3666 *	AC	TCTGTTTCTTGTCTCGGCCT	CATGGCTGCCTGAGGTTAAT
RCS3052	AAC	CACTAATTCAGACCACCAGCA	TCGGTGAGCTGTGACTAACG
RCS1327	ATC	AAACAAACCAAGCAGCACCT	ACGGTGGAATTATGGGATGA
RCS0793	AAG	TTCAACATGCAGGCTAAGAAAA	CGCAATCTTTCTTCTCATTTCA
RCS1897 *	AAAG	ATGAGCACCTTCACCAATCC	CATGTCAGCATATCCATTTTCC
TRSSRATS054	-------	AATCACGACGAGCGACAACA	GACACCGATTATGTGCAAGA
TRSSRATS055	-------	TCTCTGCTTCGCGTCTTCTC	CAATACAATCACCGCACCAG

Archive of

www.SID.ir

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 نمونه های 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 پلی‌آکریل‌آمید ۱۲ درصد استفاده شد. رنگ‌آمیزی ژل پلی‌آکریل‌آمید 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 =۰/۷۳) را نشان داد. بنابراین، از این ضریب برای رسم دندروگرام به روش UPGMA استفاده شد. البته تفاوت‌های معنی‌داری در 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 درجمعیت‌های 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 درون‌گونه‌ها و چه در بین دو گونه، تنوعی نشان نداد (شکل‌های۲ 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 دربردارنده این ریزماهواره‌هاست در گونه *T. fragiferum* در نواحی حفاظت شده واقع شده، در حالی که در گونه *T. resupinatum* در مسیر تکامل

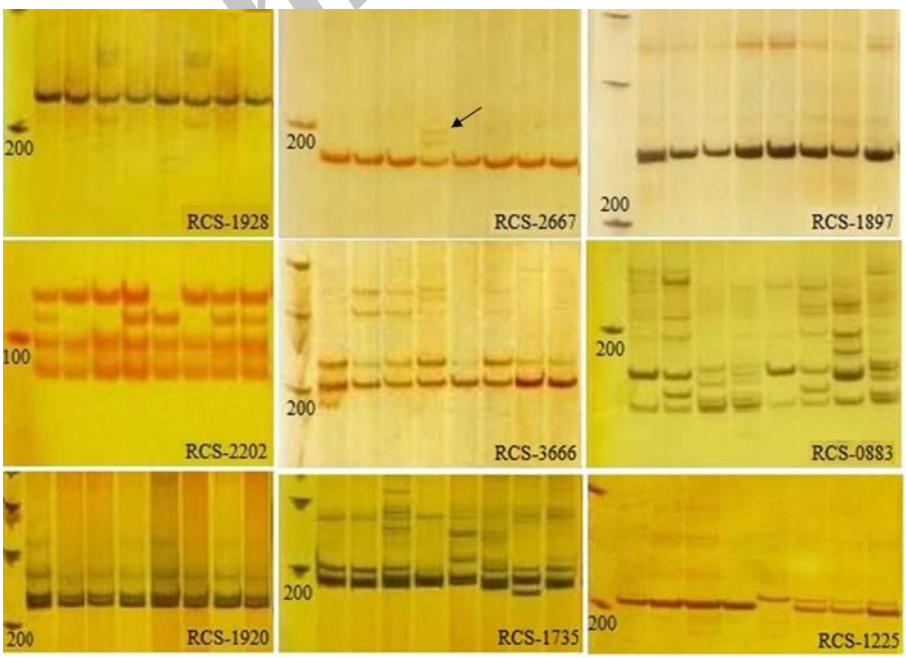
Archive of SID

www.SID.ir

دستخوش تغییراتی شده است. به بیان دیگر، این ریزماهواره‌ها 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 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).

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

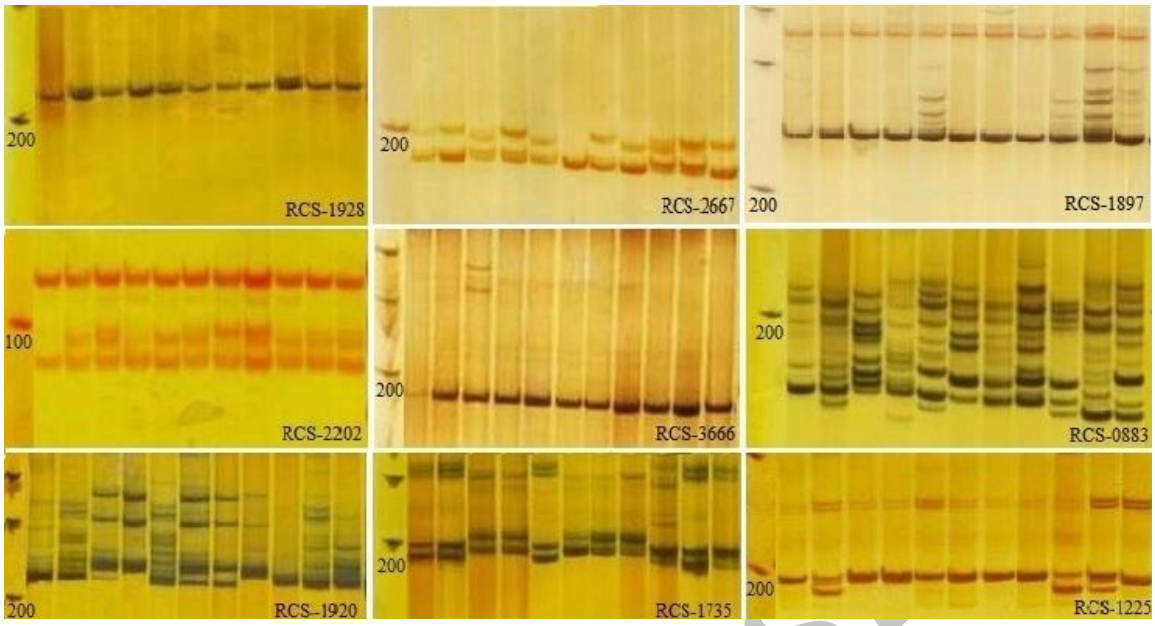
ردیف	نام آغازگر	محدوده دمای اتصال بهینه (درجه سانتیگراد)	شبدر توت‌فرنگی (*T. fragiferum*)		شبدر ایرانی (*T. resupinatum*)	
			اندازه قطعات (bp)	تعداد آلل‌ها	اندازه قطعات (bp)	تعداد آلل‌ها
۱	RCS0883	۴۷–۵۵	۱۵۰ – ۲۳۰	۱۱	۱۵۰ – ۲۳۰	۱۲
۲	RCS1225	۴۸–۵۲	۱۹۰ – ۲۵۰	۵	۱۹۰ – ۲۵۰	۵
۳	RCS1735	۴۶–۵۲	۱۸۰ – ۳۱۰	۱۱	۱۸۰ – 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*

Archive of SID

www.SID.ir



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

سایر آغازگرها در هر دو گونه تنوع در خور ملاحظه‌ای نشان دادند. همان طور که 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. fragiferum* و *T. resupinatum* 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).

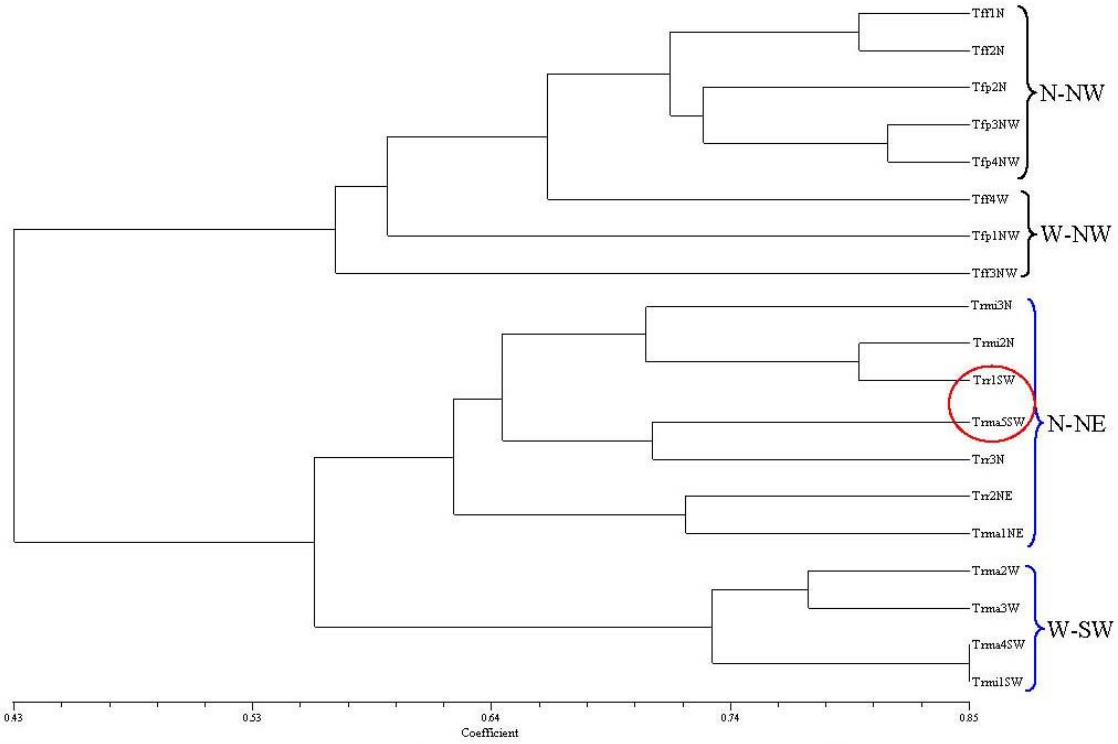
همان طور که دندروگرام (شکل ۴) نشان می‌دهد، گونه *T. fragiferum* از نظر جغرافیایی دو گروه همپوشان را تشکیل داد: خزانه ژنی شمال-شمال‌غرب و خزانه ژنی غرب-شمال‌غرب، که این دو خزانه ژنی در ناحیه شمال‌غرب همپوشانی دارند. به نظر می‌رسد که این گونه از شمال‌غرب ایران و به احتمال زیاد از کشور ترکیه وارد ایران 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-جنوب‌غرب مشاهده شد. این گروه‌بندی، منطبق با پراکنش جغرافیایی ناشی از سازگاری این گونه با محیط است. البته آثاری از نفوذ خزانه ژنی غرب-جنوب‌غرب در خزانه ژنی شمال-شمال شرق نیز مشاهده می‌گردد که

Archive of SID

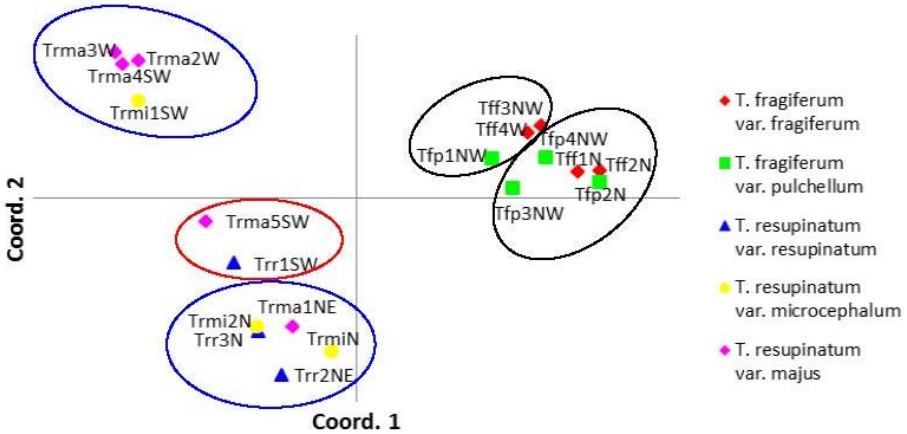
www.SID.ir

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).

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



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 = شمال‌شرق، NW = شمال‌غرب، W = غرب و SW = جنوب‌غرب. جمعیت‌هایی که توسط دایره احاطه شده‌اند نفوذی‌های خزانه ژنی غرب-جنوب‌غرب در خزانه ژنی شمال-شمال‌شرق در گونه *T. resupinatum* هستند.



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

www.SID.ir

نتایج حاصل از این مطالعه، حاکی از سطح بالای چندشکلی و انتقال‌پذیری ریزماهواره‌های معرفی شده برای *T. pratense* و *T. repens* به گونه‌های *T. fragiferum* و *T. resupinatum* است. بالا بودن انتقال‌پذیری نشان می‌دهد که این گونه ها 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 گونه های 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* 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.

منابع

جود، وی. اس.، کمپبل، سی. اس.، کلوگ، ای. اِی. 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 ژرم‌پلاسم 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. Sampoux, 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

Archive of SID

www.SID.ir

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.

Archive of SID

www.SID.ir