

بررسی تنوع در خزانه‌های ژنتیکی شبدر ایرانی (*Trifolium resupinatum* L.) موجود در بانک ژن گیاهی ملی ایران

محمد رضا عباسی

- مربی پژوهشی، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج. E-mail: rezaabbasi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۸۶/۴/۳۰ تاریخ پذیرش: ۸۶/۱۱/۲۷

چکیده

مرکز اصلی تنوع شبدر ایرانی (*T. resupinatum*) شرق مدیترانه و ایران می‌باشد. تنوع ژنتیکی خزانه‌های اول (*T. resupinatum*)، دوم (*T. clusii*) و سوم (*T. fragiferum*) شبدر ایرانی، با کشت ۳۵۹ توده از سه گونه یاد شده بالا در مزرعه، در شهریور ۱۳۸۲ طبق دستورالعمل‌های IPGRI مورد ارزیابی قرار گرفتند. تعداد روز تا گلدهی در خزانه ژنی اول، دوم و سوم به ترتیب از ۲۲ تا ۱۰۰، ۴۰ تا ۵۲ و ۵۰ تا ۱۳۰ و میانگین وزن ۱۰۰۰ دانه به ترتیب ۱/۱۵، ۰/۴۹ و ۱/۲۳ گرم متغیر بود. در شبدر توت فرنگی که به طور عمده عادت رشد خوابیده دارد فقط یک توده عادت رشد نیمه افراشته نشان داد که مناسب استفاده در سیستم‌های زراعی است. ضریب تغییرات و شاخص شنون (Shannon index) تنوع بالایی برای صفات مختلف در هر سه خزانه نشان دادند. تجزیه رگرسیون چند متغیره رابطه قوی و مثبتی بین ارتفاع گیاه در گلدهی با صفات عادت رشد گیاه و تعداد روز تا گلدهی نشان داد. این صفات ۵۸/۶ درصد از تنوع طول ساقه گیاه را در گلدهی توجیه نمودند. نتایج تجزیه خوشه‌ای به روش وارد (Ward) ژرم پلاسما توده‌های زراعی خزانه اول را در گروه اول و توده‌های وحشی خزانه اول و دوم را در گروه دوم قرار داد، در حالی که ژرم پلاسما خزانه سوم به تنهایی در گروه سوم قرار گرفت. وجود تنوع بالا در خزانه‌های ژنی اول، دوم و سوم شبدر ایرانی موجود در بانک ژن گیاهی ملی ایران، زمینه مناسبی را برای استفاده‌کنندگان از این ژرم پلاسما با ارزش جهت استفاده در ایجاد ارقام برتر شبدر ایرانی فراهم نموده است.

واژه‌های کلیدی: شبدر ایرانی، تنوع ژنتیکی، خزانه ژنی و تجزیه خوشه‌ای

مقدمه

شبدر ایرانی هستند. شبدر بعد از یونجه مهمترین گیاه علوفه‌ای دو لپه‌ای است که با سطح کشت حدود یکصد هزار هکتار جایگاه ویژه‌ای در کشور دارد (زمانیان، ۱۳۸۴).

شبدرها دارای سه مرکز اصلی تنوع به نام: اوراسیا، آمریکا و جنوب آفریقا هستند. ایران یکی از مهمترین

گیاهان علوفه‌ای جایگاه ویژه‌ای در تولید پروتئین مورد نیاز انسان (گوشت و شیر) و تأمین مواد اول پوشاک و سرپناه دارند. از مهمترین گیاهان علوفه‌ای که در کشور می‌توانند در تولید و جبران کمبود علوفه نقش مهمی داشته باشند، گیاهان جنس شبدر (*Trifolium*) از جمله

افزایش را در رشد و تولید ماده خشک نشان داد (Croft *et al.*, 2005). منابعی از سختی بذر (Hard seededness) در شبدر ایرانی گزارش شده‌است (Weihsing, 1962). همچنین Arzani و Samei (۲۰۰۴) در ارزیابی مولکولی بر اساس روش RAPD در ۲۰ توده شبدر ایرانی نشان دادند که توده‌های کازرون و هفت چین اصفهان هر کدام جداگانه در یک گروه قرار گرفتند و این تجزیه و تحلیل توانست تقریباً شبدرها را براساس منشأ آنها جدا نماید. صفات زراعی و مورفولوژیکی در گروه‌بندی و تعیین تنوع ژنتیکی با استفاده از تجزیه چند متغیره، در شبدر و گیاهان زراعی دیگر به کار گرفته شده‌است (عباسی ۱۳۸۲، Brown, 1991; Gustine & Huff, 1999; Humphreys, 1991; Caradus *et al.*, 1989; Lu-XinShi *et al.*, 1997).

اهمیت گونه‌های وحشی، در تشکیل خزانه‌های ژنی دوم و سوم است (Fehr, 1987). زمانی که به‌نژادگران نتوانند آللهای موردنظرشان را از خزانه ژنی اول بدست آورند خزانه‌های ژنی دوم و سوم را جستجو می‌نمایند (Fehr, 1987). تمام ارقام و کولتیوارهای اصلاح شده، توده‌های بومی و توده‌های وحشی در هر گونه زراعی خزانه ژنی اول را تشکیل می‌دهند. در صورتی که گونه‌های وحشی‌ای که با گونه‌های زراعی قابلیت دورگه شدن را دارند بر حسب توانایی در دورگ‌گیری خزانه‌های ژنی دومین و سومین را تشکیل می‌دهند. برای شبدر ایرانی گونه *T. clusii* خزانه ژنی دوم (Taylor & Gillette, 1988) و *T. fragiferum* و *T. neglectum* خزانه ژنی سوم (Taylor & Gillette, 1988) را تشکیل می‌دهند. بنابراین وجود خزانه‌های ژنی اول، دوم و سوم شبدر ایرانی در کشور (عباسی، ۱۳۸۵؛ مظفری و عباسی، ۱۳۸۴)، ایران را به مهمترین مرکز تنوع ژنتیکی این گونه

مراکز تنوع ژنتیکی شبدر در مرکز اصلی تنوع اوروآسیا قرار دارد (Taylor, 1985; Rechiger, 1984) مطابق نظر Taylor و همکاران (۱۹۷۹) ۶۰٪ گونه‌های شبدر منشأ اوراسیا دارند و ۷٪ گونه‌ها اندمیک منطقه ایران و تورانی و یوروسیبری هستند.

اولین مرحله در یک برنامه به‌نژادی موفق، جمع‌آوری و ارزیابی یک مجموعه جامع از ژرم پلاسما گیاه مربوطه است (Cameron, 1983). بدیهی است که ژنهای مطلوب در بهبود کیفیت و کمیت گیاهان در منابع ژنتیکی مراکز تنوع آنها حضور داشته باشند. بنابراین برای دستیابی به منابع ژنتیکی لازم برای صفات مطلوب زراعی کمی و کیفی و مقاومت به تنشهای زنده و غیر زنده شبدر جمع‌آوری جامعی از خزانه‌های ژنتیکی آن و سپس ارزیابیهای دقیق برای شناسایی ژنهای ارزشمند آن ضروری است.

مهمترین گونه‌های کشت و زرعی شبدر در ایالات متحده که بیشترین کشت و زراعت شبدر را در جهان دارد، گونه‌های شبدر قرمز (*Trifolium pratense* L.)، شبدر سفید (*T. repens* L.)، شبدر لاکسی (*T. incarnatum* L.) و شبدر دورگ (*T. hybridum* L.) هستند (Taylor, 1985). در صورتی که در ایران مهمترین گونه کشت-زرعی و بومی کشور با سطح زیر کشت حدود ۶۰ هزار هکتار شبدر ایرانی (*T. resupinatum*) می‌باشد که چهار تیپ یک چین و چند چین (سه تیپ) دارد (عباسی و زمانیان، ۱۳۸۴؛ عباسی، ۱۳۸۵). وجود تنوع ژنتیکی در شبدر ایرانی در تحقیقات متعددی نشان داده شده‌است. در بررسی تنوع برای اجزای دانه‌رست شبدر ایرانی مشخص شد که تنوع برای سرعت رشد و همچنین تجمع ماده خشک بین کولتیوارها وجود دارد، که کولتیوار Morbulk بیشترین

پلاسم‌ها از مناطق مختلف کشور جمع‌آوری و در بانک ژن گیاهی ملی ایران نگهداری می‌شوند. بذر هر توده بر روی دو خط به طول یک متر کشت گردید. فاصله ردیفها از یکدیگر ۵۰ سانتیمتر و فاصله گیاه روی ردیف ۴۰ سانتیمتر بود و بین هر دو ردیف (بلوک) یک متر فاصله قرار گرفت. از آنجا که توده‌های وحشی بعضی دارای سختی بذر بودند، بنابراین بذر این توده‌ها توسط سمباده جهت نفوذپذیر شدن خراش داده شد. پس از کاشتن بذر در خطوط کشت، روی بذر هر توده توسط مخلوط خاک برگ و ماسه (بهترین بستر ممکنه) پوشیده گردید. بذر توده‌هایی که دارای مقدار کمی و در حد چند دانه بودند، ابتدا در گلدان در گلخانه کشت شد، بعد از اطمینان از جوانه زدن، در مهر ماه همان سال در مزرعه نشاء شدند. صفات زراعی مورفولوژیکی توده‌ها با توجه به دستورالعملهای IPGRI به شرح جدول ۱ در مزرعه یادداشت برداری گردید (IPGRI, 1984, 1992).

تبدیل کرده است. بنابراین شناسایی و ارزیابی تنوع ژنتیکی این خزانه‌های ژنی، یکی از وظایف اصلی بانک ژن گیاهی ملی ایران است.

تاکنون، ارزیابی جامعی از خزانه‌های ژنی به ویژه دوم و سوم شبدر ایرانی در کشور صورت نگرفته بنابراین، این تحقیق به منظور ارزیابی، تهیه و معرفی ژرم پلاسم شبدر ایرانی انجام گردید.

مواد و روشها

در شهریور ۱۳۸۲ با کشت ۳۵۹ توده از ۳ گونه شبدر ایرانی (*T. resupinatum*)، شبدر توت فرنگی (*T. fragiferum*) و *T. clussi* در مزرعه مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج طبق دستورالعملهای استاندارد مورد ارزیابی قرار گرفتند. در شبدر ایرانی ۲۱۶ توده تیپ چند چین زراعی ۲۱ توده تیپ یک چین زراعی و ۲۳ توده را تیپ وحشی تشکیل می‌دادند. در حالی که دو گونه دیگر به طور کلی از نوع وحشی بودند. این ژرم

جدول ۱- روش امتیازدهی یا اندازه‌گیری صفات، در کلکسیون شبدر بانک ژن گیاهی ملی ایران

ردیف	صفت	نوع ارزیابی	ملاحظات
۱	عادت رشد گیاه	نمره‌دهی	۱- خوابیده، ۲- نیمه افراشته، ۳- افراشته
۲	شکل برگچه	نمره‌دهی	۱- گرد، ۲- تخم مرغی، ۳- واژ تخم‌مرغی
۳	وجود مارکر برگچه	نمره‌دهی	۱- دارد، ۲- ندارد
۴	کرکداری گیاه	نمره‌دهی	۱- بدون کرک، ۲- کرک پراکنده، ۳- کرک متراکم
۵	طول دمبرگ	سانتیمتر	تنها در شبدر ایرانی یادداشت برداری گردید.
۶	طول گیاه (ساقه اصلی) در گلدهی	سانتیمتر	
۷	تعداد روز تا گلدهی	تعداد روز	مبدأ شمارش اول فروردین می‌باشد.
۸	رنگ گل	نمره‌دهی	۱- سفید، ۴- صورتی، ۵- ارغوانی، ۶- قرمز
۹	سرعت رشد در شبدرهای ایرانی چند چین	سانتیمتر بر روز	ده روز بعد از برداشت، ارتفاع گیاه یادداشت‌برداری و تقسیم بر ۱۰ گردید.
۱۰	تعداد روز تا رسیدگی بذر	تعداد روز	مبدأ شمارش اول فروردین می‌باشد.
۱۱	رنگ بذر	نمره‌دهی	۱- زرد، ۲- قرمز قهوه‌ای، ۴- سبز مایل به قرمز، ۵- سیاه، ۶- قهوه‌ای متمایل به زرد، ۸- سبز زرد مخلوط با قهوه‌ای، ۹- سبز زرد
۱۲	وزن ۱۰۰۰ دانه	گرم	

گردیدند. محاسبات آماری توسط نرم‌افزارهای SPSS 9.1, Excel انجام گردید.

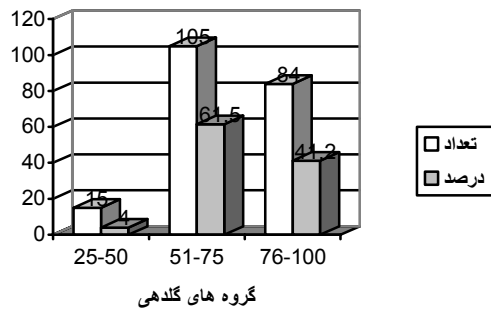
نتایج

خزانه ژنی شبدر ایرانی (*T. resupinatum*) را در مجموع ۲۵۳ توده، شامل ۲۰۴ توده زراعی چند چین، ۲۳ توده زراعی یک چین و ۲۶ توده وحشی تشکیل می‌دادند. شبدرهای چند چین از ارتفاع ۳۵۰ تا ۲۷۷۴ متری سطح دریا با میانگین ۱۸۲۸ متر جمع‌آوری شده بودند. در صورتی که نوع وحشی از ۲۱- تا ۱۹۰۰ متری با میانگین ۹۹۰ متری جمع‌آوری شده بود. عادت رشد در تیپهای چند چین و یک چین، فقط نیمه افراشته و افراشته بود. در صورتی که در تیپ وحشی علاوه بر این دو نوع، بیشتر توده‌ها دارای عادت رشد خوابیده بودند (جدول ۲).

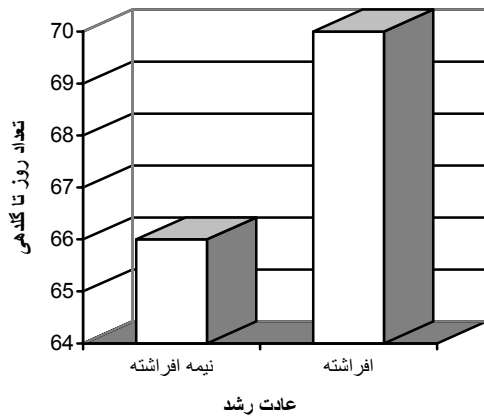
تعداد روز تا رسیدگی و گلدهی از اول بهار (یکم فروردین) به بعد محاسبه شد و در تجزیه‌های آماری وارد گردید. عاملهای آماری تمایل به مرکز و پراکنندگی صفات محاسبه شدند و ضریب تغییرات (Variation coefficient) و شاخص شنون (Shannon, 1948, Shannon index) به عنوان برآوردکننده‌ای از تنوع، به ترتیب در صفات کمی و کیفی برای هر صفت محاسبه گردیدند. در تجزیه رگرسیون از روش گام به گام برای طول ساقه اصلی گیاه به عنوان صفت وابسته در مقابل سایر صفات استفاده شد. در تجزیه کلاستر میانگین هر صفت کمی و رتبه‌ای در مجموع توده‌های یک گونه (و یا یک تیپ زراعی در گونه شبدر ایرانی) بعنوان داده مورد استفاده قرار گرفت. در این تجزیه از گروه‌بندی به روش وارد (Ward) استفاده شد. قبل از تجزیه کلاستر داده‌ها به روش Z score استاندارد

ارتفاع گیاه در گلدهی که از اجزای اصلی عملکرد علوفه است، بیشترین مقدار و میانگین را در تیپ چند چین به ترتیب با ۷۲/۵ و ۴۳/۱ سانتیمتر داشت، در صورتی که کمترین مقدار را در تیپ وحشی نشان داد (جدول ۲). تعداد روز تا گلدهی در تیپ چند چین از ۲۵ تا ۱۰۰ روز با متوسط ۷۹ روز در تغییر بود. میانگین وزن ۱۰۰۰ دانه در شبدرهای وحشی با ۰/۷۶ گرم کمترین مقدار و در تیپ یک چین با ۱/۵ گرم بیشترین مقدار را داشت (جدول ۲). رنگ گل، تنوعی در هر سه تیپ در خزانه ژنی اول نشان نداد و همگی دارای رنگ صورتی بودند، اما شدت رنگ در تیپ وحشی نسبت به دو تیپ دیگر بیشتر و صورتی پررنگ بود. فقط یک توده در شبدرهای چندچین وجود داشت که دارای گل‌های سفید و صورتی رنگ بود، در این توده به شماره 50TN01488، درصد گل‌های صورتی رنگ بیشتر بود.

وجود نشانگر برگی در بیشتر توده‌های زراعی شبدر ایرانی دیده نشده، در صورتی که در تیپ شبدر وحشی این صفت در غالب توده‌ها دیده شد. سرعت رشد مجدد که از عوامل تعیین کننده تعداد چین می‌باشد، از ۰/۲۵ تا ۴ سانتیمتر در روز با میانگین ۲/۳ سانتیمتر در روز در تیپ چند چین متغیر بود (جدول ۲). ضریب تغییرات ۲۷٪ نشان دهنده وجود تنوع قابل قبول برای این صفت در کلکسیون است. رشد مجدد در تیپهای وحشی و یک چین شبدر ایرانی دیده نشد، اما یک توده از شبدرهای یک چین جمع‌آوری شده از پیرانشهر در ارتفاع ۱۳۱۰ متر دریا در پی چین‌برداری در زمان گلدهی دارای رشد مجدد مناسبی بود. این توده از نظر تکاملی می‌تواند گذار بین تیپ یک چین (گیاهانی دارای ساقه در ابتدای بهار و عدم رشد مجدد) و چند چین (گیاهانی با دم‌برگ طویل به جای ساقه در ابتدای بهار و دارای رشد مجدد) باشد.



شکل ۱- تعداد و درصد سه گروه گلدهی، در ژرم پلاسم شبدر ایرانی چندچین



شکل ۲- میانگین تعداد روز تا گلدهی به تفکیک عادت رشد، در شبدرهای چندچین

در خزانه ژنی دوم، شبدر ایرانی تنها گونه *T. clusii* (Taylor & Gillette, 1988)، با چهار توده وجود داشت. این گونه شبدر یکساله بوده که به صورت وحشی در برخی نقاط کشور پراکنش دارد. از آنجا که تعداد نمونه‌ها در این خزانه ژنی شبدر ایرانی کم می‌باشد، بنابراین تمام داده‌های ارزیابی توده‌ها در جدول ۴ ارائه شده‌است. عادت رشد، کرکداری و شکل برگچه در این گونه تنوعی نشان ندادند و تمام توده‌ها دارای عادت رشد خوابیده، برگهای کشیده و بدون کرک بودند. ارتفاع گیاه در گلدهی از ۱۰ تا ۲۱ سانتیمتر با میانگین ۱۵/۵ سانتیمتر متغیر بود. مقدار میانگین این صفت بیشتر از مقدار آن در شبدر ایرانی تیپ وحشی (۱۴/۵ سانتیمتر، جدول ۲) بود. تعداد روز تا گلدهی از ۴۰ تا ۵۲ روز متغیر بود (جدول ۳). بنابراین از نظر این صفت، بیشتر شبیه تیپ یک چین (با تعداد روز تا گلدهی ۲۲ تا ۴۸ روز، جدول ۲) و یا زودرس چند چین (با تعداد روز تا گلدهی ۲۵-۵۰ روز، شکل ۱) در شبدر ایرانی زراعی می‌باشد. رنگ گل از سفید تا کرم و صورتی متغیر و یک توده دارای رنگ کرم و صورتی بود (جدول ۳). رنگ بذر تنوعی نشان نداد و همگی دارای بذر زرد رنگ بودند. اما وزن ۱۰۰۰ دانه از ۰/۳۴ تا ۰/۷۴ گرم در تغییر بود که نزدیک به مقادیر بدست آمده برای شبدر ایرانی وحشی می‌باشد (۰/۳۷ تا ۰/۹۷ گرم، جدول ۲).

جدول ۴- داده‌های ارزیابی ژرم پلاسم *T. clusii* خزانه ژنی دوم شبدر ایرانی

شماره نمونه	عادت رشد	کرکداری گیاه	شکل برگچه	نشانگر برگگی	ارتفاع گیاه در گلدهی	تعداد روز تا گلدهی	رنگ گلبرگ	تعداد روز تا رسیدگی	وزن هزار دانه g
50TN00908	۱	۱	۳	۱	۱۸/۵	۵۲	۱	۸۷	۰/۷۴
50TN01178	۱	۱	۳	۲	۱۲/۵	۴۷	۴ و ۲	۸۵	۰/۴
50TN01438	۱	۱	۳	۱	۱۰	۴۵	۲	۸۰	۰/۵
50TN00825	۱	۱	۳	۱	۱۲	۴۰	۲	۷۷	۰/۳۴

بسته به نوع توده، دارای نشانگر برگی و یا فاقد آن بودند. اما شاخص شنون ۰/۶۹ در این صفت بیانگر وجود تنوع بالای این صفت در کلکسیون بود (جدول ۴). طول ساقه در گلدهی از ۱۰ تا ۴۷ سانتیمتر با میانگین ۲۷ سانتیمتر در تغییر بود. این گیاه از نظر این صفت و به دلیل ویژگی ساقه‌زایی بالا می‌تواند از گونه‌های مناسب برای تولید علوفه در مراتع و چراگاههای دائمی باشد. رنگ گل از صورتی تا قرمز و ارغوانی متغیر بود که بیشترین توده دارای گل‌هایی با رنگ صورتی بودند. تعداد روز تا گلدهی از ۵۰ تا ۱۳۰ با میانگین ۱۰۶/۵ روز در تغییر بود (جدول ۵). از نظر این صفت، شبدر توت فرنگی در ردیف گونه‌های دیررس قرار گرفته که بیشتر با گروه دیررس در شبدر ایرانی چندچین هماهنگی در زمان گلدهی دارد. وزن هزار دانه از ۰/۶۲ تا ۱/۷ گرم با میانگین ۱/۲۳ گرم در تغییر بود که مقدار این صفت از مقادیر آن در تیپ وحشی شبدر ایرانی و همچنین *T. clussi* بیشتر بوده، اما تقریباً برابر تیپهای یک چین و چند چین شبدر ایرانی می‌باشد (جدولهای ۲ و ۴).

از گونه‌های *T. neglectum* و *T. fragiferum* که خزانه ژنی سوم شبدر ایرانی را تشکیل می‌دهند (Taylore & Gillett, 1988)، تنها گونه شبدر توت فرنگی (*T. fragiferum*) در کلکسیون بانک ژن گیاهی ملی ایران وجود دارد. در مجموع ۱۰۲ توده از این گونه مورد ارزیابی قرار گرفتند که از ارتفاع ۱۴- در گرگان تا ۲۱۰۰ متری از سطح دریا در استانهای آذربایجان شرقی با میانگین ۱۳۱۷ متری در کشور جمع‌آوری شده بودند. منشأ تمامی این توده‌ها مراتع و عرصه‌های طبیعی بوده و 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. شبدر توت فرنگی گونه‌ای چند ساله با عادت رشد به طور عمده خوابیده و دارای ساقه‌های رونده (استولون) بوده که با قطعه قطعه شدن ساقه به طریق رویشی علاوه بر استفاده از بذر، قابلیت تکثیر دارد و در صورت عدم قطع قسمت‌های انتهایی ساقه‌های رونده در اواخر سال اول و همچنین در سال دوم، باعث مخلوط شدن دو کرت مجاور می‌گردد. برگها

جدول ۵- عاملهای آماری پراکندگی و تمایل به مرکز صفات زراعی - مورفولوژیکی شبدر توت فرنگی،

در خزانه ژنی سوم شبدر ایرانی

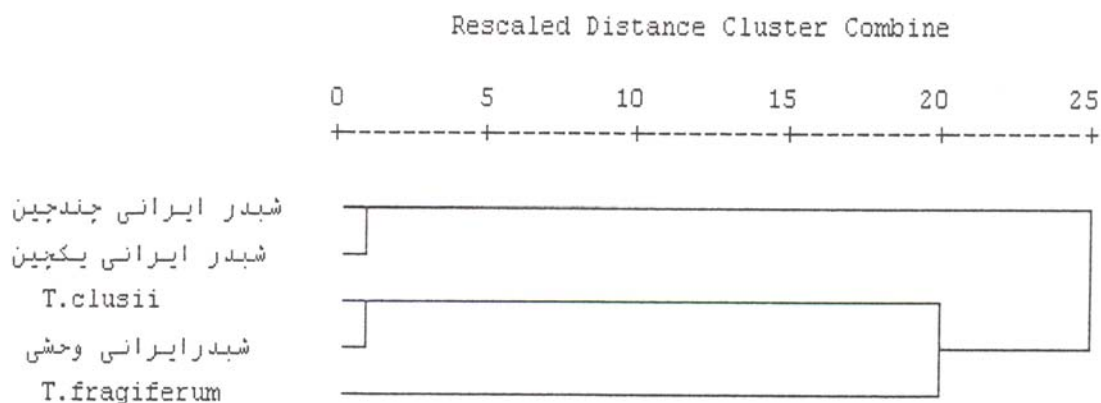
شاخص شنون	CV	میانگین	خطای استاندارد	نما	انحراف استاندارد	کمینه	بیشینه	صفت
				۳۵۵۲		۲۸۵۲	۳۹۳۲	عرض جغرافیایی
				۵۰۵۹		۴۴۳۷	۵۴۰۸	طول جغرافیایی
	۰/۳۶	۱۳۱۷	۴۸/۵	۱۳۲۰	۴۷۱	-۱۴	۲۱۰۰	ارتفاع جغرافیایی
۰/۱۳				۱		۱	۲	عادت رشد
۰/۲۳				۱		۱	۲	کرکداری گیاه
۰/۲۹				۳		۳	۸	شکل برگچه
۰/۶۹				۲		۱	۲	نشانگر برگی
	۰/۳۴	۲۷	۱	۳۰	۹	۱۰	۴۷	ارتفاع گیاه در گلدهی
	۰/۱۴	۱۰۶/۵	۱/۵	۱۱۰	۱۴/۴	۵۰	۱۳۰	تعداد روز تا گلدهی
	۰/۱۰	۴/۲	۰/۰۵	۴	۰/۴۲	۴	۶	رنگ گلبرگ
	۰/۰۶	۱۳۶/۲	۱/۲	۱۴۰	۷/۹	۱۰۷	۱۵۰	تعداد روز تا رسیدگی
	۰/۲۲	۱/۲۳	۰/۰۴	۱/۳۰	۰/۲۶	۰/۶۲	۱/۷	وزن هزار دانه g
۱/۲۷				۸		۳	۹	رنگ بذر

اول تیپهای یک چین و چند چین از شبدر ایرانی کنار هم قرار گرفتند. در خوشه دوم، تیپ وحشی شبدر ایرانی همراه با گونه *T. clussi* ظاهر شدند، در صورتی که شبدر توت فرنگی به تنهایی در خوشه سوم ظاهر گردید. ژرم پلاسما حاصل از توده‌های بومی خزانه ژنی اول در خوشه اول ظاهر گردیدند، در صورتی که ژرم پلاسما وحشی خزانه اول در کنار ژرم پلاسما خزانه دوم و در خوشه دوم ظاهر شدند. در نهایت ژرم پلاسما خزانه سوم شبدر ایرانی به تنهایی در خوشه سوم قرار گرفت (شکل ۳).

تجزیه رگرسیون چند متغیره برای صفت ارتفاع گیاه که از اجزای اصلی عملکرد علوفه است در مقابل سایر صفات نشان داد که رابطه قوی و مثبتی بین ارتفاع گیاه (Y) و صفات عادت رشد (X_1) و تعداد روز تا گلدهی (X_2) وجود دارد. در مجموع، این دو صفت ۵۸/۶ درصد ($r^2=0.568$) از تنوع طول ساقه گیاه را در گلدهی توجیه نموده و معادله مربوطه به قرار زیر است:

$$Y = -6.6 + 12.1X_1 + 0.24X_2 \quad (\text{معادله ۱})$$

نتایج تجزیه خوشه‌ای سه خوشه را که از فاصله ۲۰ از یکدیگر جدا شده بودند را نشان داد (شکل ۳). در خوشه



شکل ۳- دندروگرام حاصل از میانگین داده‌های زراعی- مورفولوژیکی در ژرم پلاسم خزانه‌های اول (شبدرهای ایرانی، یک چین، چند چین وحشی)، دوم (*T. clusii*) و سوم (*T. fragiferum*) در تجزیه خوشه‌ای بر اساس روش وارد.

بحث

گیاه با فنوتیپ بدون مارکر برگ‌ناشی از ژنوتیپ مغلوب هموزیگوت است (Taylore, 1985) که این موضوع می‌تواند برای شبدرهای ایرانی نیز مورد بررسی قرار گیرد و در صورت پیوستگی ژن کنترل کننده این صفت با صفات مهم زراعی به دلیل ظهور سریع صفت (در ابتدای دوره رویشی) در تحقیقات به‌نژادی شبدر مورد استفاده قرار گیرد. وجود تنوع بالا در تعداد روز تا گلدهی، قابلیت گروه‌بندی ژرم پلاسم چند چین را به سه گروه زودرس، متوسط‌رس و دیررس نشان می‌دهد. بر این اساس، تیپ چند چین به سه گروه قابل تقسیم می‌باشد. گروه زودرس با دوره گلدهی ۲۵ تا ۵۰ روز که ۱۵ توده و یا ۷/۵ درصد مواد را تشکیل می‌دادند، گروه متوسط‌رس با دوره گلدهی ۵۱ تا ۷۵ روز که بیشترین تعداد را در مجموعه با ۱۰۵ توده داشتند و سوم گروه دیررسها که با ۸۴ توده ۴۱/۱ درصد از مواد تیپ چند چین را تشکیل می‌دادند (شکل ۱). وجود چنین گروه‌بندی در گزارشهای قبلی برای شبدر ایرانی بیان شده است (عباسی، ۱۳۸۵؛ عباسی و زمانیان، ۱۳۸۴) و همچنین از روشهای گروه‌بندی و نیازهای به‌نژادی در شبدرها می‌باشد (Frame et al., 1998).

در تیپ زراعی چند چین شبدر ایرانی ملاحظه می‌گردد که تنوع موجود در کشور در این شبدر جمع‌آوری شده است (جدول ۱). در صورتی که در تیپ یک چین به دلیل توده‌های کمی که جمع‌آوری شده شاید نیاز به جمع‌آوری تکمیلی باشد. هرچند که وجود تنوع در ژرم پلاسم یک چین (جدولهای ۲ و ۳) نشان داد که ژرم پلاسم با ارزشی در این تیپ نیز موجود می‌باشد. از طرفی، پراکنش محل جغرافیایی خزانه ژنتیکی ژرم پلاسم شبدر ایرانی (جدول ۲) وجود سازگاری و استفاده در این مواد را برای مناطق مختلف نشان داد. وجود شاخص شنون ۰/۷۶ برای صفت عادت رشد در تیپ وحشی شبدر ایرانی نسبت به ۰/۴۱ و ۰/۵۲ به ترتیب در تیپهای چند چین و یک چین وجود تنوع بالا را در تیپ وحشی برای این صفت نشان می‌دهد (جدول ۳). همچنین به دلیل وجود تنوع در صفت نشانگر برگ‌ناشی و از آنجا که این صفت به عنوان یک نشانگر در مراحل اول رشد گیاه بروز می‌یابد، بنابراین در تحقیقات به‌نژادی و دورگ‌گیری شبدر ایرانی می‌تواند کاربرد داشته باشد. در شبدر قرمز

طور عمده این ژرم پلاسماها گیاهانی با عادت رشد افراشته خواهند بود. از طرفی، چنین گیاهانی دیررس تر بوده و تعداد روز تا گلدهی آنها بالا می‌باشد. بنابراین نتایج این تجزیه بایستی در استفاده به‌نژادگران از خزانه‌های ژنی شبدر ایرانی مد نظر قرار گیرد.

نتایج تجزیه خوشه‌ای نشان داد که استفاده از صفات زراعی - مورفولوژیکی در گروه‌بندی خزانه‌های ژنی شبدر ایرانی توانسته است خزانه‌های ژنی این شبدر را همان‌گونه که تحقیقات Taylore و Gillett (۱۹۸۸) با استفاده از قابلیت دورگ‌گیری نشان داده‌اند، مشخص و جدا نماید (شکل ۳). همچنین این نتیجه اشاره دارد که در دورگ‌گیری شبدر ایرانی با خزانه ژنی دوم بهتر است ابتدا با تیپ وحشی شبدر ایرانی دورگ‌گیری انجام شده و سپس نتایج حاصل با تیپهای یک چین و چند چین زراعی تلاقی شوند. این موضوع به دلیل شباهت زیاد شبدر ایرانی وحشی با *T. clusii* (خزانه ژنی دوم) از جمله عادت رشد و مهمتر از آن وزن هزار دانه مشابه در دو نوع شبدر است که مشکلات کمتری برای جنین دورگ ایجاد خواهد نمود. استفاده از صفات زراعی و مورفولوژیکی در گروه‌بندی، تعیین قرابت ژنتیکی و همچنین تعیین و تشخیص خزانه ژنتیکی با استفاده از روشهای آماری تجزیه چند متغیره، در تحقیقات سایر محققان بر روی شبدر و گیاهان زراعی دیگر به کار گرفته شده است (عباسی و همکاران، ۱۳۸۳؛ عباسی، ۱۳۸۲؛ Gustine & Huff, 1999, Brown, 1991; Humphreys, 1991; Gradus et al., 1989; Lu-Xinshi et al., 1997).

وجود تنوع بالا در خزانه‌های ژنی اول، دوم و سوم شبدر ایرانی موجود در بانک ژن گیاهی ملی ایران زمینه مناسبی را برای استفاده‌کنندگان از این ژرم پلاسما با ارزش جهت استفاده در ایجاد ارقام برتر شبدر ایرانی فراهم نموده است.

طرفی، میانگین تعداد روز تا گلدهی در تیپ چند چین به تفکیک عادت رشد، نشان داد گیاهانی با عادت رشد افراشته دارای زمان گلدهی بیشتری نسبت به گیاهانی با عادت رشد نیمه افراشته بودند، میانگین این صفت به ترتیب ۷۰ و ۶۶ روز در عادت رشد افراشته و نیمه‌افراشته بود (شکل ۲).

در خزانه ژنی دوم (*T. clusii*)، تمامی توده‌ها از مراتع به صورت وحشی جمع‌آوری شده بودند و هیچ نمونه زراعی در کشور از این گونه وجود نداشت (عباسی، ۱۳۸۵). این مواد از ارتفاع ۱۲۲۰ تا ۱۶۰۰ متری سطح دریا از استانهای کرمانشاه، آذربایجان شرقی و غربی جمع‌آوری شده بودند. تعداد کم ژرم پلاسما، جمع‌آوری تکمیلی را در این خزانه ژنی محرز می‌دارد.

در خزانه ژنی سوم (شبدر توت فرنگی)، بیشتر قریب به اتفاق توده‌ها دارای عادت رشد خوابیده بودند، اما فقط یک توده جمع‌آوری شده از ارتفاع ۲۰۱۰ متری سطح دریا از شهرستان کازرون عادت رشد نیمه افراشته را نشان داد که مناسب استفاده در سیستم‌های زراعی می‌باشد. این گیاه به طور عمده فاقد کرک است، اما کرک پراکنده در ۴ توده جمع‌آوری شده از خراسان، سمنان، فارس و آذربایجان غربی مشاهده شد. همچنین به دلیل ساقه زایی بالا، طول ساقه بالا، فقدان کرک در بیشتر توده‌ها، نرمی بافت رویشی و تولید بیومس بالا شبدر توت فرنگی می‌تواند به عنوان یکی از مناسبترین گونه‌ها در مراتع و چراگاههای پایا و همچنین در صورت نیاز به‌نژادگران در برنامه‌های دورگ‌گیری با شبدر ایرانی مورد استفاده قرار بگیرد.

نتایج رگرسیون در معادله ۱ نشان می‌دهد که گیاهانی با ساقه‌های طولتر دارای عادت رشد افراشته نیز می‌باشند. به عبارت دیگر، در صورت استفاده از ژرم پلاسماهایی با ساقه‌های طولتر در هر سه خزانه ژنی شبدر ایرانی، به

سپاسگزاری

این تحقیق قسمتی از طرح تحقیقاتی شماره ۷۹۲۳۳-۱۲-۱۰۰ سازمان ترویج، آموزش و تحقیقات کشاورزی است. بنابراین، نویسنده بدین وسیله مراتب سپاس و قدردانی خود را از مدیریت محترم مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر و به ویژه مدیریت محترم بخش تحقیقات ژنتیک و بانک ژن گیاهی ملی ایران به جهت فراهم کردن بستر مناسب انجام تحقیق، ابراز می‌دارد.

منابع مورد استفاده

- زمانیان، م.، ۱۳۸۴. بررسی اثر فصل کاشت بر تولید علوفه گونه‌های شبدر. نهال و بذر جلد ۲۱، شماره ۲، صفحات ۱۷۳-۱۵۹.
- عباسی، م.ر.، ۱۳۸۵. گزارش نهایی طرح جمع آوری، شناسایی و ارزیابی ذخایر توارثی جنس شبدر به منظور حفاظت و استفاده. مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال، سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی.
- عباسی، م.ر.، ۱۳۸۲. تنوع ژنتیکی در کلکسیون سورگوم بانک ژن ملی ایران. نهال و بذر، جلد ۱۹ شماره ۳: ۳۶۷-۳۵۳.
- 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.
- عباسی، م.ر.، واعظی، ش. و همتی، ف.، ۱۳۸۳. شناسایی دونوع خزانه ژنتیکی یونجه‌های زراعی ایرانی بر اساس داده‌های زراعی- مورفولوژیکی. دوازدهمین کنفرانس زیست‌شناسی سراسری ایران، همدان.
- مظفری، ج. و عباسی، م.ر.، ۱۳۸۴. مقاله کلیدی: ذخایر توارثی گیاهان علوفه‌ای در بانک ژن گیاهی ملی ایران. اولین همایش ملی گیاهان علوفه‌ای کشور، کرج.
- Arzani, A. and Samei, K., 2004. Assessment of genetic diversity among Persian clover cultivars as revealed by RAPD markers. Genetic Variation for Plant Breeding, pp. 85-88. 2004 EUCARPIA & BOKU – University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna. Printed in Austria.
- Brown, J.S., 1991. Principal component and cluster analysis of cotton cultivar variability across the U.S. cotton belt. *Crop Sci.* 31: 915-922.
- Cameron, D.F., 1983. To breed or not to breed. Pp. 238-250 in *Genetic Resources of Forage Plants* (J.G. McIvor and R.A. Bray, eds.). CSIRO, East Melbourne.
- Caradus, J.R., MacKey, A.C., Woodfield, D.R., van den Bosch J. and Wewala, S., 1989. Classification of world collection of white clover cultivars. *Euphytica* 42: 183- 196.
- Croft, V.M., Smith, K.F., McFarlane, N.M. and Kirkwood, B.D., 2005. Variation for components of seedling vigour among Persian clover cultivars. <http://www.regional.org.au/au/asa/2001/p/9/croft.htm>
- Fehr, W.R., 1987. Principles of cultivar development: Vol. 1. Theory and technique. McGraw Hill, New York.
- Frame, J., Charlto, J.F.L. and Laidlaw, A.S., 1998. *Temperate forage legume*. CAB International, Wallingford, Oxon, OX10 8 DE, UK.
- Gustine, D.L. and Huff, D.R., 1999. Genetic variation within and among white clover populations from managed permanent pastures of the Northeastern USA. *Crop Science*, 39: 524-530.
- Humphreys, M.O., 1991. A genetic approach to the multivariate differentiation of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) populations. *Heredity* 66:437-443.
- IPGRI, 1984. Descriptors for Forage Legume. Rome, Italy
- IPGRI, 1992. Descriptors for white clover. Rome, Italy
- Lu-XinShi; He-Qi; Lu-XS, and He-Q., 1997. Genetic diversity for Chinese alfalfa cultivars and landraces. *Grassland of China*. No. 6, 1-6.
- Rechiger, K.H., 1984. *Flora Iranica*. No: 157, Akademische Druck, Verlagssanstalt, Graz-Austria.
- Shannon, C.E., 1948. A mathematical theory of communication. *Bell Syst. Techn. Journal* 27: 379-423.
- Taylor, N.L., 1985. *Clover science and technology*. Madison, Wisconsin, USA.
- 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.
- Taylor, N.L., Quesenberry, K.H. and Anderson, M.K., 1979. Genetic system relationships in *Trifolium*. *Econ. Bot.* 33:431-441.
- Weihing, R.M., 1962. Selecting Persian clover for hard seed. *Crop Science*, 2:381-382

Genetic diversity of Persian clover (*Trifolium resupinatum*) gene pools in National Plant Gene Bank of Iran

M.R. Abbasi

- Seed and Plant Improvement Institute, Karaj, Iran. E-mail: rezaabbasi@yahoo.com

Abstract

Iran and the east of Mediterranean area is the main center for genetic diversity of Persian clover (*Trifolium resupinatum*). To investigate the genetic diversity of Persian clover for primary (*T. resupinatum*), secondary (*T. clusssi*) and tertiary (*T. fragiferum*) gene pools, 359 accessions were evaluated in the field according to IPGRI descriptors in 2003. Days to flowering differed from, 22 to 100 days, 40 to 52 days, and 50 to 130 days for the primary, secondary, and tertiary gene pools, respectively. Thousand seed weight means were 1.15, 0.49, and 1.23 g in the primary, secondary, and tertiary gene pools, respectively. In *T. fragiferum*, mainly showed prostrate growth habit trait, one accession showed growth habit that could be used in the agronomic systems. Phenotypic variation (CV) and Shannon indices showed high levels of diversity for most of the traits. A positive linear relationship between stem length at the flowering as depended trait with growth habit and days to flowering traits expressed of 58.6% ($r^2=0.586$) variation. Cluster analysis classified the gene pools in three groups. Landraces from primary gene pool appeared in the first cluster, whereas in the second cluster the wild germplasm of primary gene pool came together with secondary gene pool materials. Finally, the tertiary gene pool germplasms revealed in the third cluster. Existence of high levels of diversity in the primary, secondary and tertiary gene pools of Persian clover in National Plant Gene Bank of Iran can provide a potent germplasm for improvement of high potential Persian clover lines.

Key words: Persian clover, genetic diversity, gene pool and cluster analysis.