

بررسی فنتیکی گونه‌های جنس *Trifolium* با استفاده از صفات دانه گرده

فهیمة سلیم پور^{۱*}، کلاله مصطفوی^۲، شادی حاج رسولیها^۲، فریبا شریف نیا^۱

^۱ گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاداسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران
^۲ گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاداسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
^۳ گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاداسلامی، واحد علوم پزشکی، تهران، ایران

E-mail: dsalimpour@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۴/۲۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱/۳۰

چکیده

کشور ایران با داشتن ۴۹ گونه علفی یکساله و چندساله از جنس *Trifolium*، بعد از ترکیه یکی از مراکز اصلی تنوع گونه‌های این جنس محسوب می‌شود. این جنس مشتمل بر ۶ بخش می‌باشد. بین گونه‌های هر بخش تشابه فراوانی از نظر خصوصیات بخش زایشی بویژه صفات مربوط به کاسه گل به چشم می‌خورد که شناسایی تاکسونومیک آنها را با مشکل مواجه ساخته است. در پژوهش حاضر، به منظور بررسی کارایی صفات دانه گرده در شناسایی و مطالعه روابط گونه‌ها با یکدیگر، ۳۶ گونه این جنس با کمک میکروسکوپ الکترونی لایه نگار (SEM) مورد تحقیق قرار گرفتند. نتایج نشان می‌دهد که دانه گرده سه شیار روزن دار، عمدتاً استوانه‌ای تا استوانه کشیده بوده و تزئینات سطح اگزین از نوع مشبک، چروکیده، حفره‌دار، سوراخدار، نقطه دار یا رگه دار است. گونه‌های نزدیک *T. bullatum* و *T. tomentosum* با توجه به نوع تزئینات به راحتی قابل تفکیک هستند. گونه *T. aureum* با داشتن تزئینات از نوع چروکیده (*Rugulate*) از گونه مشابه *T. campestre* که دارای تزئینات مشبک (*Reticulate*) است قابل تفکیک است. همچنین گونه *T. pilulare* متفاوت ترین تزئینات را در بین گونه‌های این جنس دارا است. برطبق آنالیز خوشه‌ای دو گروه اصلی مشخص گردید. خوشه اول شامل گونه‌هایی از دو بخش *Vesicaria*، *Trifolium* بوده و خوشه دوم به سه زیر خوشه تقسیم شده است. در دندروگرام حاصله گونه‌ها براساس بخش تاکسونومیک خود جدا نشدند. این نشان دهنده ناهمگن بودن جنس می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: ایران، دانه گرده، شبدر، *Trifolium*

مقدمه

این جنس خویشاوندی نزدیکی با جنس‌های یونجه و شنبلیله دارد. شبدر علاوه بر اینکه یک گیاه زراعی علوفه‌ای خوب و مناسب است، به دلیل میزان محصول زیاد، کیفیت علوفه و سازگاری نسبت به خاک، یک

شبدر یکی از مهمترین گیاهان در تولید علوفه دامی به شمار می‌رود. این جنس پس از یونجه، دومین گیاه لگوم علوفه‌ای با ارزش کشور محسوب می‌شود.

T. hybridum, *T. radicosum*, *T. montanum* و ۲ گونه علفی یکساله *T. nigrescens*, *T. glomeratum* است. بین گونه چندساله *T. ambiguum* و *T. montanum*، از نظر خصوصیات اندام‌های زایشی، تشابه ریختی بالایی وجود دارد که شناسایی و رده‌بندی آن‌ها را با مشکل مواجه می‌سازد.

بخش *Vesicaria* علاوه بر گونه زراعی *T. resupinatum*، مشتمل بر سه گونه یکساله دیگر شامل *T. clusii*، *T. bullatum*، *T. tomentosum* و سه گونه چندساله *T. fragiferum*، *T. tumens*، *T. physodes* می‌باشد [۱۴]. کلیه گونه‌های این بخش از نظر خصوصیت کاسه گل منحصر به فرد هستند به طوری که کاسه گل دارای ۵ دندانه بوده که به هنگام رسیدن میوه به طور نامتقارن رشد کرده، کیسه‌ای و متورم شده و سطح کاسه تورینه‌ای می‌گردد. ۵ دندانه کاسه نیز به شکل دو لب نابرابر مشخص می‌گردند که لب بالا ۲ دندانه‌ای و لب پایین ۳ دندانه‌ای شده، شکل و طول دندانه‌های لب بالایی یکی از ویژگی‌های مهم در شناسایی گونه‌ها به شمار می‌رود. براین اساس،

لگوم مرتعی برتر نیز به شمار می‌رود. از سوی دیگر، از دیدگاه تاکسونومی جنس شبدر به علت داشتن انواع متفاوت گل آذین اعم از چتری، خوشه‌ای، دیهیم، کاپیتول، سنبله، تفاوت در ساختار کاسه گل به صورت متورم و کیسه‌ای یا غیر متورم و نیز تغییرات در غلاف از نظر نوع نیام چند دانه شکوفا یا نیام تک دانه ناشکوفا، سبب شده است تا شبدر (*Trifolium*) به عنوان یک جنس ناهمگن (هتروژن) معرفی گردید [۸، ۹، ۱۴]. این جنس دارای ۸ بخش می‌باشد که ۶ بخش آن در دنیای قدیم و ۲ بخش آن در دنیای جدید پراکنش یافته است. براساس اطلاعات کنونی ۱۱۰ گونه شبدر در قالب ۷ بخش در ناحیه مدیترانه واقع شده‌اند [۱۳]. ایران پس از ترکیه یکی از بهترین مراکز تنوع جنس شبدر با داشتن حدود ۴۹ گونه یکساله و چندساله در قالب ۶ بخش به شمار می‌رود. [۱۰، ۱۱] (جدول ۱).

Lotoidea قدیمی‌ترین و ابتدایی‌ترین بخش این جنس به حساب می‌آید. این بخش در ایران شامل ۵ گونه علفی چندساله *T. repens*، *T. ambiguum*

جدول ۱- بخش‌ها و گونه‌های جنس شبدر در ایران و جهان

بخش	تعداد گونه	
	در جهان	در ایران
<i>Lotoidea</i>	۹۹	۷
<i>Mistyllus</i>	۹	۱
<i>Vesicaria</i>	۷	۷
<i>Trifolium</i>	۷۲	۲۶
<i>Trichocephalum</i>	۹	۲
<i>Involucrarium</i>	۲۲	-
<i>Paramesus</i>	۲	-
<i>Chronosemium</i>	۱۷	۶
	۲۴۷	۴۰

تزئینات سطح آگزین و صفات کمی نظیر طول محور استوائی (E) و یا طول محور قطبی (P) و نیز تعداد بالای دانه‌گرده تولید شده در هر گیاه، سبب شده است تا گیاه‌شناسان بیش از پیش از صفات‌گرده در تسهیل‌شناسایی‌های ریخت‌شناسی بهره‌گیرند.

دانه‌گرده در جنس شبدرعموماً از نوع سه‌شکافی روزن‌دار (Trizoncolporate) بوده که شکل عمومی آن از منظر استوایی بیضی‌شکل (Elliptic) یا سه‌گوش‌نوک‌کند (Triangular-obtuse) و از دید قطبی مثلثی سربریده (Truncated-triangular) می‌باشد. تزئینات سطح آن از نوع مشبک (Reticulate) تا لانه‌زنبوری (Faveolate) است. روزن‌ها (Pori) معمولاً در ناحیه استوایی قرار داشته و کمتر دیده می‌شوند. سطح آگزین بطور مشخص در قطبین ضخیم نمی‌باشد. شکاف (Apocolpium) نسبتاً بزرگ دیده شده که کل طول آن در منظره استوایی قابل مشاهده است.

تا کنون تلاش‌های متعددی در شناسایی گونه‌های شبدر بر اساس ریخت‌شناسی دانه‌گرده صورت گرفته است. ارتمن و همکاران براساس اندازه و شکل دانه‌گرده، کلید شناسایی ۱۱ گونه‌ی شبدر منطقه اسکاندیناوی را ارائه داد [۴]. همچنین ۴۵ گونه‌ی شبدر بومی شمال آمریکا در سال ۱۹۷۳ به کمک میکروسکوپ الکترونی TEM (Transition Electron Microscope) و میکروسکوپ الکترونی لایه‌نگار (Scanning Electron Microscope) SEM بررسی شد و کلید شناسایی برای آنها ارائه گردید [۵]. زهری و هلریه کمک میکروسکوپ نوری و میکروسکوپ الکترونی لایه‌نگار، مطالعه‌ی جامعی را بر روی ۴۵ گونه از بخش *Lotoidae* براساس ریخت‌شناسی دانه‌گرده، تزئینات سطح آگزین و ابعاد دانه‌گرده انجام دادند و ۷ تیپ مختلف دانه‌گرده را در گونه‌های این بخش مشخص

گونه‌های یکساله *T. tomentosum*، *T. bullatum* و *T. clusii* دارای تشابه مورفولوژیکی بالایی به خصوص از نظر صفات مربوط به شکل برگچه، شکل گل‌آذین، شکل و طول دندان‌های لب بالایی کاسه در مرحله میوه و نیز تزئینات سطح کاسه در مرحله میوه و رنگ جام گل می‌باشد [۱۱].

بخش *Mistyllus* شامل ۱ گونه *T. spumosum* می‌شود که براساس شواهد مورفولوژیکی و مطالعات فیلوژنی مولکولی، خویشاوندی نزدیکی بین این گونه و گونه‌های بخش *Vesicaria* بویژه از نظر ساختار گل دیده می‌شود [۱]. در بخش *Trifolium* که بزرگ‌ترین بخش این جنس در کشور است، ۲۶ گونه علفی یکساله و چندساله دیده می‌شود. وجود انواع گل‌آذین، تنوع در ریخت‌شناسی ساختار گل بویژه خصوصیات کاسه گل وجود گوشوارک برگی به شکل گریبان در برخی گونه‌ها و نیز ویژگی‌های برگچه‌های برگ، سبب بروز مشکلاتی در شناسایی و تفکیک گونه‌های این بخش شده است. بخش *Chronosemium* شامل ۵ گونه یکساله *T. aureum*، *T. grandiflorum*، *T. micranthum*، *T. campestre* و *T. spadiceum* و یک گونه چندساله *T. badium* در ایران می‌شود. دو گونه *T. aureum* و *T. campestre* دارای شباهت‌های ریخت‌شناسی متعدد به ویژه در شکل درفش گل، شکل گل‌آذین و خصوصیات دندان‌های کاسه گل می‌باشند. همچنین دو گونه *T. spadiceum* و *T. badium* نیز در صفات گل دارای تشابه بالایی هستند بطوریکه مطالعات ریخت‌شناسی به تنهایی قادر به تفکیک و شناسایی آنها نمی‌باشد. از سوی دیگر، مطالعات‌گرده‌شناسی، منبع قابل اعتمادی در مطالعات تاکسونومی گیاهی محسوب می‌شود [۲]، [۷]. صفات کیفی مهم دانه‌گرده نظیر تنوع در شکل،

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

نمونه‌های گیاهی مربوط به هفت گونه بخش *Vesicaria*، یک گونه بخش *Mistyllus* هفت گونه بخش *Lotoidae*، ۱۴ گونه بخش *Trifolium* و شش گونه بخش *Chronosemium* و یک گونه از بخش *Trichocephalum* جمع‌آوری شده از نقاط مختلف کشور و نگهداری شده در کلکسیون شبدر بانک ژن گیاهی ملی ایران، در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۲).

کردند. آنها کوچکترین دانه گرده را در دو گونه *T. suffocatum*، *T. retusum* مشاهده نمودند [۱۴]. پرون و همکاران دانه های گرده در خانواده Fabaceae را مورد بررسی قرار دادند که تنها یک گونه از جنس شبدر با نام *T. repens* در این مطالعه بررسی شد [۹]. در تحقیق حاضر، ویژگی‌های دانه گرده در ۳۶ گونه جنس شبدر در ایران به منظور مطالعه روابط گونه‌های هر بخش با یکدیگر با استفاده از صفات ریخت شناسی دانه گرده و آنالیز تاکسونومی عددی مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گرفته است.

جدول ۲- گونه های مورد مطالعه جنس شبدر و رویشگاه آنها (*Trifolium*)

گونه گیاهی Species	رویشگاه Habitat
<i>T. fragiferum</i>	گلستان: گنبد کاووس، ۸۰ متر، سلیم پور و قنواتی
<i>T. physodes</i>	آذربایجان: سردشت به پیرانشهر، ۱۵۰۰ متر، سلیم پور و قنواتی
<i>T. tumens</i>	تهران: پلور، ۱۲۰۰ متر، سلیم پور و قنواتی
<i>T. resupinatum</i>	خوزستان چغازنبیل، ۱۰۰ متر، سلیم پور و قنواتی
<i>T. bullatum</i>	لرستان: دیمله، ۱۵۰۰ متر، سلیم پور و قنواتی
<i>T. tomentosum</i>	کرمانشاه: کرد غرب، ۳۵۰ متر، سلیم پور و قنواتی
<i>T. clusii</i>	خوزستان: دزفول به شوش، ۱۵۰ متر، سلیم پور و قنواتی
<i>T. spumosum</i>	لرستان: دیمله، ۱۵۰۰ متر، سلیم پور و قنواتی
<i>T. radicosum</i>	تهران: توچال، ۳۷۰۰ متر، سلیم پور
<i>T. repens</i>	تهران: پلور، ۲۳۰۰ متر، مصطفوی
<i>T. ambiguum</i>	اردبیل: کوه سبلان، شابیل، ۲۴۴۰ متر، مصطفوی
<i>T. nigrescens</i>	تهران: پلور، ۲۳۰۰ متر، سلیم پور
<i>T. montanum</i>	اردبیل: کوه سبلان، شابیل، ۲۴۴۰ متر، مصطفوی
<i>T. glomeratum</i>	گیلان: باتلاق بوشمن، ۲۱-، ایران شهر
<i>T. hybridum</i>	زنجان: بناب به طرف چفتان، ۱۵۰۰ متر، موسوی
<i>T. arvense</i>	کرمانشاه: بیستون، ۱۴۲۰ متر، سلیم پور و قنواتی
<i>T. leucantum</i>	کرمانشاه: قصر شیرین، ۳۵۰ متر، سلیم پور و قنواتی
<i>T. echinatum</i>	کرمانشاه: سرپل ذهاب، ۷۰۰ متر، سلیم پور و قنواتی
<i>T. scabrum</i>	لرستان: خرم آباد، روستای ریمله، ۱۵۰۰ متر، سلیم پور و قنواتی
<i>T. cherleri</i>	کرمانشاه: قصر شیرین، ۳۵۰ متر، سلیم پور و قنواتی
<i>T. purpureum</i>	کرمانشاه: کرد غرب به سرپل ذهاب، ۱۲۴۰ متر، سلیم پور و قنواتی
<i>T. dasyarum</i>	لرستان: خرم آباد، ۱۲۰۰ متر، سلیم پور و قنواتی
<i>T. phleoides</i>	ارومیه: تپه های غرب ده سیلوانا، ۱۶۰۰ متر، سلیم پور و قنواتی

گونه گیاهی Species	رویشگاه Habitat
<i>T. ochroleucum</i>	گلستان: جنگل گلستان، ۹۰۰ متر، سلیم پور و قنواتی
<i>T. alexandrinum</i>	مازندران: قائمشهر به کیاکلا، ۸۰ متر، سلیم پور و قنواتی
<i>T. angustifolium</i>	مازندران: میان کاله، ۲۰۰ متر، سلیم پور و قنواتی
<i>T. medium</i>	لرستان: خرم آباد ۱۲۰۰ متر، سلیم پور و قنواتی
<i>T. micrantum</i>	گیلان: رشت، ۴۰ متر، ایرانشهر
<i>T. grandiflorum</i>	آذربایجان شرقی: مغان، گرمی، ۱۲۰۰ متر، ایرانشهر
<i>T. campestre</i>	فارس: چنارشاهیجان، ۸۱۰ متر، سلیم پور
<i>T. aureum</i>	آذربایجان شرقی: سراب امیرجه به طرف سیلان، ۳۰۰۰ متر، رجامند
<i>T. badium</i>	مازندران: تونل کندوان، ۱۷۱۰ متر، سلیم پور
<i>T. spadiceum</i>	آذربایجان شرقی: سراب امیرجه به طرف سیلان، ۳۰۰۰ متر، ایزدیار
<i>T. pilulare</i>	آذربایجان غربی: سردشت به پیرانشهر، ۱۵۰۰ متر، سلیم پور و قنواتی

روی هر یک از نمونه‌ها اندازه‌گیری شد. شکل و تزئینات سطح آگزين بررسی شدند.

جهت بررسی اصطلاحات گرده، از فرهنگ اصطلاحات گرده و اسپور و از کتاب منوگراف شبدر زهری و نیز کتاب گرده‌شناسی استفاده شده است [۳، ۴، ۱۴]. همچنین تجزیه خوشه‌ای به روش Ward بر روی صفات کد داده شده صورت گرفت و دندروگرام طبقه‌بندی گونه‌ها ترسیم شد (نمودار ۱).

نتایج

دانه گرده در کلیه گونه‌های جنس *Trifolium* که در ایران رویش دارند از نوع سه شیار روزن دار^۱ با شیارهای دمبلی شکل و دارای اپرکول درمحل روزن^۲ می‌باشند. از منظر استوایی شکل دانه گرده در اکثر گونه‌ها بیضی شکل^۳ تا مستطیلی^۴ و در گونه‌های *T. dasycarum*, *T. alexandrinum*, *T. ochroleucum* از بخش *Trifolium* و نیز گونه *T. radicosum* از

مطالعه به کمک میکروسکوپ الکترونی لایه نگار

به منظور مطالعه دانه گرده، از هر گونه یک گل سالم و مناسب انتخاب و به کمک استریومیکروسکوپ، پرچم‌ها از سایر قسمت‌های گل جدا و سعی شد بساک‌هایی انتخاب شوند که شکوفا نشده باشند تا از خطر احتمال آلودگی به گرده‌های سایر گیاهان جلوگیری شود. سپس بر روی یک لامل، مقدار کمی چسب مایع قرار داده شد و بساک‌ها را با نوک سوزن شکافته و به آرامی تکان داده تا دانه‌های گرده روی لامل قرار گیرند. لامل حاوی دانه گرده روی پایه مخصوص قرار داده شد و توسط دستگاه Putterr Coater با لایه نازکی از طلا پوشانده شد. بعد از دادن پوشش طلا، پایه حامل لامل درون محفظه میکروسکوپ الکترونی قرار گرفت.

صفات مورد اندازه‌گیری

برای هر گونه، ۳ دانه گرده از دید قطبی، استوایی مورد بررسی قرار گرفتند. صفات کمی نظیر طول محور قطبی (P)، طول محور استوایی (E)، نسبت طول محور قطبی به طول استوایی (P/E)، طول شیار بر

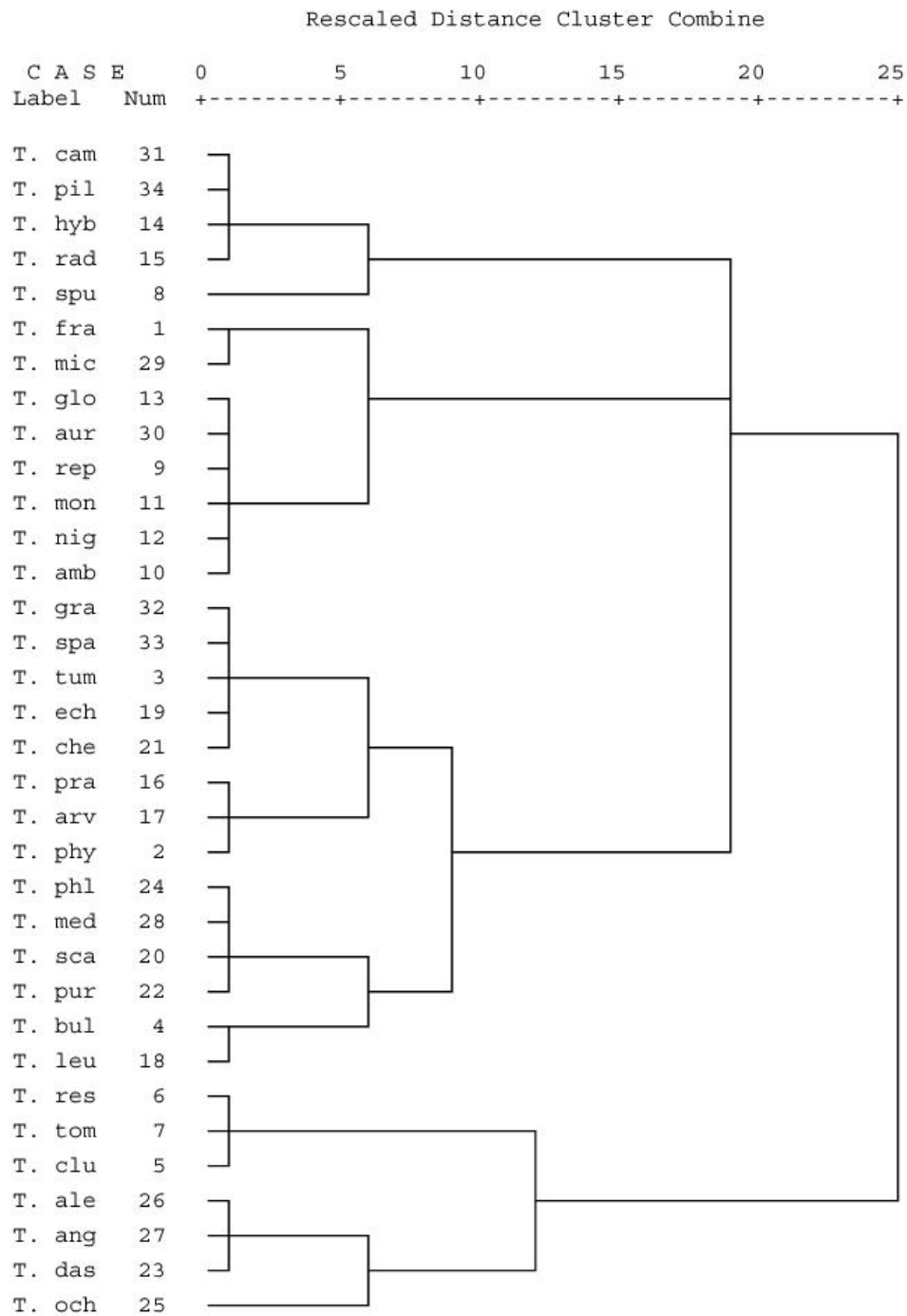
¹ Trizoncolporate

² Opercule

³ Elliptic

⁴ Rectangular

Dendrogram using Average Linkage (Between Groups)



شکل ۱- دندروگرام تجزیه‌ای خوشه‌ای گونه‌های جنس شبدر

سوراخدار^۶ می‌باشد این مطالعه نشان داد که

بخش *Lotoidae* از نوع کروی^۱ شکل بود.

- ^۲ Reticulate
- ^۳ Scrobiculate
- ^۴ Faveolate
- ^۵ Rugulate
- ^۶ Perforate

تزیینات سطح آگزین در کلیه نمونه‌های بررسی شده از نوع مشبک^۲، نقطه دار^۳، حفره دار^۴، چروکیده^۵ و

^۱ Circular

کوچک‌ترین دانه گرده در بین گونه‌های مورد مطالعه مربوط به گونه *T. clusii* و بزرگترین دانه گرده مربوط به گونه *T. pretense* بوده است. حداقل طول محور قطبی $17 \mu\text{m}$ مربوط به گونه *T. cherleri* و حداکثر $39 \mu\text{m}$ مربوط به گونه *T. fragiferum* بوده است.

نتایج نشان دهنده آن است که خصوصیات کمی و کیفی دانه گرده جهت شناسایی و تفکیک گونه‌های مورد مطالعه حائز اهمیت است. در بخش *Vesicaria*، کوچک‌ترین دانه گرده مربوط به گونه *T. clusii* و بزرگترین دانه گرده مربوط به گونه *T. fragiferum* است. تزئینات سطح آگزین در کلیه گونه‌های بررسی شده از نوع مشبک منظم، مشبک نامنظم، حفره‌دار یا رگه دار و تزئینات در طول شیار صاف تا چروکیده می‌باشد. طول محور قطبی حداقل $27/1 \mu\text{m}$ مربوط به گونه *T. clusii* و حداکثر $40 \mu\text{m}$ مربوط به گونه *T. fragiferum* بوده و طول محور استوایی حداقل $15 \mu\text{m}$ در گونه *T. clusii* و حداکثر $19/4 \mu\text{m}$ در گونه *T. tumens* است (جدول ۳). در بخش *Lotoidae* متوسط اندازه دانه گرده $33/40 \text{mm}$ - $20/17 \text{mm}$ برای طول محور قطبی و $22/19 \text{mm}$ برای قطر محور استوایی، متغیر است (جدول ۳).
 سطح بام در اکثر گونه‌های این بخش، به حالت چروکیده (*Rugulate*) است. تنها در دو گونه *T. radicosum* و *T. hybridum* تکتوم به حالت مشبک می‌باشد. وضعیت دریچه‌ها، نشان دهنده سه شیاره بودن دانه گرده آنها است. حداقل طول محور قطبی، $22/22 \text{mm}$ مربوط به گونه *T. glomeratum* و حداکثر $33/40$ ، مربوط به گونه *T. repens* بوده و حداقل طول محور استوایی، $13/77$ مربوط به گونه *T. glomeratum* و حداکثر $20/17$ ، مربوط به گونه *T. radicosum* بوده است. در بخش *Trifolium* از مجموع ۱۴ گونه بررسی شده، حداقل طول محور قطبی $17 \mu\text{m}$ و مربوط به گونه *T. cherleri* و حداکثر $31 \mu\text{m}$ مربوط به گونه *T. phleoides* می‌باشد. طول محور استوایی حداقل $20 \mu\text{m}$ در گونه *T. echinatum* و حداکثر $42 \mu\text{m}$ مربوط به گونه *T. pratense* است (جدول ۳). تزئینات از نوع مشبک منظم تا حفره‌دار است. تنها در گونه *T. ochroleucum* از نوع سوراخدار است.

جدول ۳- مقایسه صفات دانه گرده در گونه‌های جنس شبدر (*Trifolium*)

گونه	طول محور قطبی (μm)	طول محور استوایی (μm)	نسبت طول محور قطبی به محور استوایی	طول شیار (μm)	شکل گرده	تزئینات سطح آگزین	تزئینات در طول شیار
<i>T. fragiferum</i>	39	18.3	2.1	31.25	استوانه ای Oblong	مشبک حفره دار Reticulate-faveolate	صاف Smooth
<i>T. physodes</i>	32	19.15	1.07	19.4	استوانه ای Oblong	مشبک منظم Regular-reticulate	چروکیده Rugulate
<i>T. tumens</i>	32.25	19.25	1.06	24.5	استوانه ای Oblong	مشبک منظم Regular-reticulate	صاف Smooth
<i>T. bullatum</i>	30.5	19.5	1.5	16.6	استوانه ای Oblong	مشبک رگه دار Nerved-reticulate	ناصاف Not smooth
<i>T. clusii</i>	27.1	15	1.8	15.05	استوانه ای Oblong	مشبک نقطه دار Reticulate-scribulate	صاف Smooth

گونه	طول محور قطبی (μm)	طول محور استوایی (μm)	نسبت طول محور قطبی به محور استوایی	طول شیار (μm)	شکل گرده	تزئینات سطح اگزین	تزئینات در طول شیار
<i>T. resupinatum</i>	30.45	18.35	1.6	21	استوانه ای Oblong	مشبک حفره دار Reticulate- faveolate	صاف Smooth
<i>T. tomentosum</i>	34.75	17.5	1.75	22.4	استوانه ای Oblong	مشبک حفره دار Reticulate- faveolate	صاف Smooth
<i>T. spumosum</i>	34.75	17.15	2.09	30.3	استوانه ای Oblong	مشبک منظم Regular- reticulate	حفره دار Faveolate
<i>T. repens</i>	23.4	16.91	1.97	30.44	استوانه ای Oblong	حفره دار Faveolate	چروکیده Rugulate
<i>T. ambigum</i>	23.58	19.91	1.18	21.93	استوانه‌ای Oblong	مشبک حفره دار Reticulate- faveolate	چروکیده Rugulate
<i>T. montanum</i>	26.82	19.92	1.34	22.77	استوانه ای Oblong	حفره دار Faveolate	چروکیده Rugulate
<i>T. nigrescens</i>	26.21	16.98	1.54	20.97	استوانه ای Oblong	چروکیده Rugulate	چروکیده Rugulate
<i>T. glomeratum</i>	22.22	13.77	1.61	16.88	استوانه ای Oblong	چروکیده Rugulate	چروکیده Rugulate
<i>T. hybridum</i>	28.74	15.95	1.8	23.13	استوانه ای Oblong	مشبک حفره دار Reticulate- faveolate	مشبک حفره دار Reticulate- faveolate
<i>T. radicosum</i>	22.19	20.17	1.1	16.38	مدور Circular	مشبک Reticulate	چروکیده Rugulate
<i>T. pratense</i>	25	42	0.6	38.5	استوانه ای Oblong	مشبک Reticulate	چروکیده Rugulate
<i>T. arvense</i>	20	26	0.77	13	استوانه ای Oblong	مشبک Reticulate	چروکیده Rugulate
<i>T. leucantum</i>	23	35	0.67	28	استوانه ای Oblong	حفره دار Faveolate	چروکیده Rugulate
<i>T. echinatum</i>	20	20.1	1	15	استوانه ای Oblong	مشبک Reticulate	صاف Smooth
<i>T. scabrum</i>	25	35.2	0.72	22	استوانه ای Oblong	حفره دار Faveolate	صاف Smooth
<i>T. cherleri</i>	17	27	0.63	20	استوانه ای Oblong	نقطه دار Scrobiculate	صاف Smooth
<i>T. purpureum</i>	17	25	0.68	22	استوانه ای Oblong	نقطه دار Scrobiculate	صاف Smooth
<i>T. dasyarum</i>	26	32	0.81	21	مدور Circular	چروکیده حفره دار Rugulate-faveolate	چروکیده Rugulate
<i>T. phleoides</i>	31	32	0.97	11	استوانه ای Oblong	مشبک Reticulate	صاف Smooth
<i>T. ochroleucum</i>	30	32	0.94	15	مدور Circular	حفره دار Faveolate	صاف Smooth
<i>T. alexandrinum</i>	21	23	0.92	15	مدور Circular	مشبک Reticulate	چروکیده Rugulate
<i>T. angustifolium</i>	22	25	0.88	23	استوانه ای Oblong	مشبک Reticulate	چروکیده Rugulate

گونه	طول محور قطبی (μm)	طول محور استوایی (μm)	نسبت طول محور قطبی به محور استوایی	طول شیار (μm)	شکل گرده	تزئینات سطح اگزین	تزئینات در طول شیار
<i>T. striatum</i>	19.5	15.5		18.9	استوانه ای Oblong	حفره دار Faveolate	صاف Smooth
<i>T. medium</i>	24	26	0.92	22	استوانه ای Oblong	مشبک Reticulate	صاف Smooth
<i>T. micranthum</i>	19.6	16	1.22	18.11	استوانه ای Oblong	حفره دار Faveolate	صاف Smooth
<i>T. aureum</i>	21.3	13.8	1.54	13.3	استوانه ای Oblong	چروکیده Rugulate	چروکیده Rugulate
<i>T. badium</i>	23.5	17.7	1.3	13.95	استوانه ای Oblong	حفره دار Faveolate	صاف Smooth
<i>T. campestre</i>	26.44	16.61	1.59	21	استوانه ای Oblong	مشبک Reticulate	منفذ دار porate
<i>T. grandiflorum</i>	28.2	2.35 ^۳	1.26	19.45	استوانه ای Oblong	مشبک Reticulate	صاف Smooth
<i>T. spadiceum</i>	19.18	18.56	1.22	11.9	استوانه ای Oblong	چروکیده Rugulate	صاف Smooth
<i>T. pilulare</i>	25.98	16.29	1.59	19.6	استوانه ای Oblong	نقطه دار Scrobiculate	نقطه دار Scrobiculate

هستند. بنابراین خصوصیات گرده با ریخت شناسی تا حدود زیادی همخوانی نشان می دهد.

بحث

با توجه به کلیه بررسی های به عمل آمده می توان انواع تزئینات دانه گرده در جنس شیدر را به تیپ های زیر تقسیم نمود:

تیپ مشبک منظم (Reticulate) که در تعداد بالایی از گونه های بخش های مختلف دیده می شود.

تیپ مشبک نامنظم (Irregular Reticulate) که خود به انواع رگه دار و حفره دار تقسیم می شود.

تیپ منقوط (Scrobiculate)، تیپ چروکیده (Rugulate) و تیپ حفره دار (Faveolate). براساس نتایج حاصل، در بخش *Vesicaria*، گونه های *T. tomentosum* و *T. bullatum* که دارای ساختار مورفولوژیکی بسیار مشابهی هستند، از لحاظ ریخت

مطالعه بر روی گونه های بخش *Chronosemium*، نشان داد که اندازه دانه گرده بین $19/6 \mu m$ تا $19/6 \mu m$ برای طول محور قطبی و $13/8 \mu m$ تا $28/2 \mu m$ برای طول محور استوایی متغیر است. بیشترین طول محور قطبی مربوط به گونه *T. grandiflorum* و برابر با $28/2 \mu m$ و کمترین مربوط به *T. micranthum* و برابر با $19/6 \mu m$ است. تزئینات سطح دانه گرده فقط در گونه *T. badium* حفره دار است. از دو گونه بخش *Tricocephalum* موجود در ایران، گونه *T. pilulare* بررسی گردید. تزئینات گرده در این گونه از نوع منقوط است که با هیچکدام از گونه های مورد مطالعه شباهت ندارد. این مسیله در مورفولوژی گیاه نیز دیده می شود. بطوریکه تنها در این گونه تعداد زیادی گل عقیم بدون جام همراه با گل های زایا دیده می شود. در سایر گونه های بررسی شده، تمام گل های یک گل آذین دارای جام وزایا

مشبک منظم است. تشابه مورفولوژیکی این گونه به ویژه از نظر تورم و کیسه‌ای شدن کاسبرگ لوله‌ای در مرحله میوه که ویژگی شاخص بخش *Versicaria* می‌باشد نظریه ادغام این گونه را در بخش *Versicaria* تقویت می‌کند. براساس تحقیقی که با کمک مارکر مولکولی ITS روی گونه‌های جنس شبدر صورت گرفته است نیز نتیجه مشابهی حاصل شده مبنی بر اینکه گونه‌های دو بخش *Versicaria* و *Mistyllus* دارای خویشاوندی نزدیکی هستند و در یک گروه واحد قرار می‌گیرند [۱۳].

همچنین بدرجه خویشاوندی نزدیک گونه‌های دو بخش به ویژه از نظر مورفولوژی، عدد کروموزومی مشابه ($2n=16$) و طول کروموزومی مشابه در گونه‌های دو بخش اشاره داشته است [۱]. دربخش *Lotoidae*، گونه *T. repens* که به لحاظ ریخت شناسی با گونه اجدادی خود، یعنی *T. nigrescens* شباهت زیادی نشان می‌دهد و از طریق صفات مربوط به دانه گرده و بذر آنها از گونه اجدادی خود، مجزا گردید. بنابراین داده‌های حاصل از مطالعات گرده شناسی، نقش مهمی را در تفکیک گونه‌های مذکور داشته است. این دو گونه در صفاتی مثل شکل برگچه، شکل گل آذین، شکل بخش آزاد گوشوارک دارای شباهت‌هایی هستند (اشکال ۹ و ۱۱).

گونه چندساله *T. radicosum* که گونه انحصاری ایران است، تنها گونه این بخش است که دارای دانه گرده با شکل کروی و تزئینات مشبک است (شکل ۱۳). این گونه با داشتن صفاتی نظیر جام گل ارغوانی، درفش مستطیلی و دانه بیضی شکل بیشترین تفاوت ریخت شناسی را با سایر گونه‌های این بخش داراست. مطالعات ریخت‌شناسی و سیتوتاکسونومی هم مؤید تفاوت این گونه با سایر گونه‌های بخش *Lotoidae*

شناسی گرده نیز نزدیکی زیادی را نشان می‌دهند. اما نوع تزئینات دانه گرده که یکی از صفات مهم در گرده شناسی محسوب می‌شود در *T. tomentosum* مشبک حفره‌دار و در *T. bullatum* مشبک رگه دار است که این صفت شاخص به همراه تزئینات سطح قطبی می‌تواند دو گونه فوق را از هم متمایز سازد. گونه *T. clusii* نیز براساس صفات تزئینات سطح آگزین، طول محور قطبی و استوایی از ۲ گونه فوق که به دلیل مورفولوژی مشابه به ویژه در بخش‌زایشی به سختی مشخص می‌شود، قابل تفکیک گشته است.

از سوی دیگر، مقایسه صفات کمی و کیفی نشان می‌دهد که دانه گرده گونه *T. fragiferum* در مجموع دارای بیشترین اختلاف با سایر گونه‌ها به ویژه *T. clusii* است. این گونه چندساله با داشتن ریشه‌های نابجا در محل گره‌های ساقه و گل آذین بیضوی شکل و نوع زیستگاه مناسب رویش این گیاه که عمدتاً نواحی مرطوب با آب و هوایی معتدل و سرد است، به عنوان نماینده بخش *Versicaria* معرفی شده است. خصوصیات دانه گرده در این گونه نیز تأییدی بر شاخص بوده صفات این گونه در بخش *Versicaria* می‌باشد. از سوی دیگر ژیلت معتقد است ارتباط مستقیمی بین خصوصیات دانه گرده و تاکسونومی در جنس شبدر وجود دارد [۵]. براساس تحقیقات قبلی به عمل آمده ارتباط خویشاوندی نزدیکی میان گونه‌های بخش *Versicaria* و بخش *Mistyllus* گزارش شده است [۱۲، ۱۳]. صفات ریخت شناسی گرده، نشان داد که گونه *T. spumosum* که تنها گونه گزارش شده از بخش *Mistyllus* در کشور ایران می‌باشد، خویشاوندی تاکسونومیک نزدیکی با گونه چندساله *T. physodes* از بخش *Versicaria* نشان می‌دهد. تزئینات گرده در این گونه بسیار شبیه به گونه *T. physodes* و به شکل

گونه‌ها انجام گردید. مطابق با دندروگرام ۱، گونه‌ها در چهار خوشه اصلی قرار گرفته‌اند. هر خوشه نیز به دو زیر خوشه تقسیم شده است. همانطور که در نمودار دیده می‌شود، گونه‌های یک یا چند ساله در خوشه‌های جدا قرار نگرفته‌اند. به عنوان مثال گونه چند ساله *T. fragiferum* در نزدیکی گونه یکساله *T. micranthum* و در زیرخوشه دوم قرار گرفته است و یا گونه‌های یکساله *T. grandiflorum*، *T. echinatum*، *T. spadiceum* و *T. cherleri* در زیرخوشه اول از خوشه سوم در مجاورت با گونه چند ساله *T. tumens* قرار دارند. در عین حال گونه‌های بخش‌های مختلف نیز در این دندروگرام از یکدیگر جدا نشده‌اند. این امر نشان‌دهنده آن است که خصوصیات گرده‌قادر به تفکیک گونه‌های یکساله از چند ساله و یا جدا نمودن گونه‌های بخش‌های مختلف در جنس شبدر نمی‌باشد. در مجموع نتایج نشان دهنده آن است که جنس شبدر، جنسی ناهمگن (Heterogene) محسوب می‌شود و صفات گرده بویژه نوع تزئینات سطح آگزین کارایی زیادی در تفکیک و شناسایی گونه‌های نزدیک به هم دارد.

منابع

- [1] Badr A.. 1995. Electrophoretic studies of seed protein in relation to chromosomal criteria and the relationships of some taxa of *Trifolium*. *Taxon*; 44: 183 – 191.
- [2] Ellison N. W., Liston A., Steiner J. J., Williams W. M. and Taylor N. L. 2006. Molecular phylogenetics of the Clover genus (*Trifolium*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*; 39(3): 688- 705.
- [3] Erdtman G., Praglowski, J. and S. Nilsson. 1969. An Introduction to a Scandinavian Pollen Flora. vol. 2. Almquist & Wiksell, Stockholm.
- [4] Erdtman G.. 1989. Handbook of palynology (An introduction to the Study of pollen grains and spores).

بوده است [۱۱]. به نظر می‌رسد که شواهد بیوسیتماژیک نشانگر جدا کردن گونه فوق در بخش جداگانه می‌باشد. در عین حال صفات دانه گرده نتوانسته است دو گونه *T. ambigum* و *T. montanum* را از هم تفکیک کند. همچنین در بخش *Trifolium* گونه *T. ochroleucom* که دارای تشابه ریختی بالایی با گونه *T. caucasicum* است، توسط تزئینات دانه گرده از گونه‌های نزدیک خود جدا می‌شود. در بخش *Chronosemium*، دو گونه *T. aureum* و *T. campstre* که از لحاظ خصوصیات ریخت‌شناسی بسیار بهم شبیه هستند، از نظر نوع تزئینات دانه گرده با هم متفاوت می‌باشند. بطوریکه در *T. aureum* تزئینات از نوع چروکیده و در *T. campstre* از نوع مشبک است. این مساله نشانگر کارایی دانه گرده در تفکیک دو گونه فوق می‌باشد. این تفاوت در تزئینات سطح قطبی این دو گونه نیز مشاهده گردیده است. با توجه به تفاوت در اندازه‌های کمی و نوع تزئینات سطح دانه گرده در گونه *T. spadiceum* که از نوع چروکیده است، می‌توان به راحتی گونه‌های *T. badium* و *T. spadiceum* را از هم تفکیک نمود. قابل ذکر است که گونه *T. pilulare* تنها گونه ایست که در این مطالعه تزئینات از نوع منقوط نشان داد.

از نظر مورفولوژی نیز تنها گونه‌ای است که دارای تعداد زیادی گل عقیم بدون جام همراه با گل‌های زایا می‌باشد. در سایر گونه‌های بررسی شده، تمام گل‌های یک گل‌آذین دارای جام وزایا هستند. بنابراین خصوصیات گرده با ریخت‌شناسی این گونه نیز تا حدود زیادی همخوانی نشان می‌دهد. همچنین به منظور بررسی توانایی دانه گرده در تفکیک گونه‌های یکساله از چند ساله دندروگرام تجزیه خوشه‌ای

- [5] Gillett J. M..1973. Pollen Morphology and it's relationship to the North American *Trifolium* species. *Pollen & Spores*; 15: 91 – 205.
- [6] Hoen P.. 1999. Glossary of Pollen and Spore terminology.
- [7] Moore F.. 1991. Pollen analysis; 83 – 159. Springer.
- [8] Preveen A. and Qaiser M.. 1998. Pollen flore of Pakistan. VIII leguminosae (subfamily Papilinoideae). *Turkish Journal of Botany*; 22: 73 – 91.
- [9] Rechinger K. H.. 1984. Flora des Iranischen hochlandes und der umrahmenden CCBIRCE. Verlagsanstalt. 157: 275 – 325.
- [10] Salimpour F. Mozafari M. and Asadi M.. 2003. Biosytematic study of *Trifolium* genus (*Vesicaria* section) in Iran. PhD Thesis.
- [11] Salimpour F. Mozafari M. and Asadi M.. 2003. A simple technique for determination of ploidy level using chloroplast number in stomatal guard cells of *Trifolium* plants. *Pajouhesh-Sazandegi*; 59: 54-59.
- [12] Sveinsson S. and Cronk Q. 2014. Evolutionary origin of highly repetitive plastid genomes within the clover genus (*Trifolium*). *BMC Evolutionary Biology*; 14: 228-238.
- [13] Watson L. E., Sayed A. and Badr A.. 2000. Molecular phylogeny of old world *Trifolium* (Fabaceae). based on plastid and nuclear markers. *Plant Systematic and Evolution*; 224: 153 – 171.
- [14] Zohary M. and Heller D. .1984. The genus *Trifolium*. *Israel Academy of Science and Humanities. Flora Palestina*; 2: 157 – 193.

