

ZEMEŅU ĀBOLIŅA (*TRIFOLIUM FRAGIFERUM*) LATVIJAS POPULĀCIJAS BIOLOĢISKĀS UN ĢENĒTISKĀS DAUDZVEIDĪBAS IZVĒRTĒJUMS

ASSESSMENT OF BIOLOGICAL AND GENETIC DIVERSITY OF THE LATVIAN POPULATION OF STRAWBERRY CLOVER (*TRIFOLIUM FRAGIFERUM*)

Gederts Ieviņš¹, Una Andersone-Ozola¹, Dainis Ruņģis², Astra Jēkabsons¹, Andis Karlsons³

¹Latvijas Universitātes Bioloģijas fakultāte, ²LVMZI „Silava”, ³Latvijas Universitātes

Bioloģijas institūts
gederts.ievins@lu.lv

Abstract. The aim of this study was to characterize biological and genetic diversity of geographically isolated micropopulations of strawberry clover in Latvia, with a special attention to resistance to abiotic and anthropogenic factors, as well as dependence on nitrogen fertilizer and symbiosis of N_2 -fixing bacteria. Plants from all micropopulations were characterized by relatively high resistance to the tested adverse environmental factors, but there were significant differences between individual micropopulations in terms of biomass accumulation and changes in physiological parameters due to these factors. The analysis of genetic diversity showed a low degree of diversification within individual populations, but micropopulations were genetically differentiated from each other, and a significant difference emerged between "marine" and "river / lake" coastal habitats. The observed genetic and physiological diversity shows that the geographically isolated populations of strawberry clover in Latvia represent different ecotypes and are considered to be a valuable biological resource of crop wild relatives.

Key words: crop wild relatives, forage crops, genetic diversity, strawberry clover, stress tolerance.

Ievads

Pasaulē notiekošās klimata izmaiņas un pieaugošā antropogēnā ietekme palielina arī agroekosistēmu heterogenitāti. Lai saglabātu stabilas un kvalitatīvas ražas šādos apstākļos, ir jāpalielina kultūraugu šķirņu daudzveidība, īpašu uzmanību pievēršot to abiotiskā stresa izturībai. Kultūraugu savvaļas radnieki ir īpaši vērtīgs resurss šī mērķa sasniegšanā (Dempewolf et al., 2014). Latvijā kultūraugu savvaļas radnieki ir pārstāvēti galvenokārt ar lopbarībā izmantojamām kultūrām – ilggadīgajām graudzālēm un tauriņziežiem. Raugoties no lauksaimniecības ilgtspējas viedokļa, tauriņzieži ir īpaši vērtīgi gan kā proteīna avots, gan saistībā ar augsnes slāpekļa satura palielināšanu gumiņbaktēriju simbiozes rezultātā (Zhang et al., 2019). Vairāku āboliņu ģints (*Trifolium*) sugu savvaļas ģenētiskie resursi ir pētīti Latvijā un citās Baltijas valstīs (Dabkevičiene, Dabkevičius, 2005; Rancane et al., 2006; Bērziņa et al., 2008; Paplauskienė, Dabkevičienė, 2012; Lemežienė et al., 2018), taču nav pieejama informācija par īpaši retas sugas zemeņu āboliņa (*Trifolium fragiferum* L.) bioloģisko un ģenētisko daudzveidību. Lai gan Eiropā zemeņu āboliņu saimnieciski neizmanto, tas tiek kultivēts kā mērenās joslas daudzgadīgo ganību komponents citos reģionos (ASV, Austrālija, Jaunzēlande), un tam piemīt unikālas agronomiskās īpašības, tai skaitā izturība pret augsnes sāļumu, pārlietu lielu mitrumu un sausumu, kā arī slimībām (Townsend, 1985; Nichols et al., 2012). Ziemeļeiropā *T. fragiferum* ir raksturīgā suga Eiropas aizsargājamā biotopā „Baltijas boreālā piekrastes pļava” 1630* (Rūsiņa, 2013), bet Latvijā tai ir īpaši aizsargājamās sugas statuss.

Šī pētījuma mērķis bija raksturot Latvijā sastopamo zemeņu āboliņa ģeogrāfiski izolēto mikropopulāciju bioloģisko un ģenētisko daudzveidību, īpašu uzmanību pievēršot izturībai pret abiotiskajiem un antropogēnajiem faktoriem, kā arī atkarībai no slāpekļa papildmēslojuma un gumiņbaktēriju simbiozes. Tika izvirzīta hipotēze, ka *T. fragiferum* mikropopulācijas ir ģenētiski diferencēti ekotipi ar atšķirīgām fizioloģiskajām īpašībām.

Materiāli un metodes

Eksperimentiem izmantoja *Trifolium fragiferum* sēklu materiālu no astoņām identificētajām Latvijas mikropopulācijām (atradnēm) (1. att.). Bioloģisko un ģenētisko salīdzinājumu veica ar Austrālijas komercšķirni ‘Palestine’ (TF8). Ģenētiskās daudzveidības pētījumā izmantoja arī zemeņu āboliņa paraugus no Bornholmas (Dānija, TF9) un Hāpsalu (Igaunija, TF10), bet sālsizturības pētījumā arī TF9. Veģetācijas trauku eksperimentus realizēja kontrolētos apstākļos siltumnīcā, salīdzinot izvēlēto genotipu augšanas un fizioloģisko reakciju uz pieaugošu augsnes sāļumu,

paaugstinātu mitrumu un augsnes appludināšanu, atkārtotu nogriešanu, atkārtotu nobradāšanu, pieaugošu smago metālu (Pb un Cd) koncentrāciju, slāpekļa papildmēslojumu un simbiozi ar natīvajām gumiņbaktērijām. Augus audzēja individuāli 1.3 L plastmasas konteineros kvarca smilšu un komerciālas dārza augsnes maisījumā (1:3) siltumnīcā ar papildapgaisojumu (fotonu plūsmas blīvums $380 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperiods 16 h), 24/16 °C temperatūrā (diena/nakts), relatīvais gaisa mitrums 60–70%. Augus mēsloja ar Yara Tera Kristalon Red un Yara Tera Calcinit mēslojumu reizi divās nedēļās. Eksperimentu gaitā veica hlorofila koncentrācijas un hlorofila *a* fluorescences mērījumus ar nedestruktīvām metodēm. Eksperimentu noslēgumā augus individuāli sadalīja pa daļām (saknes, stolonis, lapu kāti, lapu plātnes), noteica lapu skaitu un atsevišķo daļu svaigo un sauso masu. Līdztekus veica arī pētījumu lauka apstākļos Latvijas zemeņu āboliņa atradnēs, lai noskaidrotu augsnes ķīmiskā sastāva un augu minerālās barošanās īpatnības. Detalizēta informācija par augu pavairošanu, kultivēšanas apstākļiem siltumnīcā, veiktajām analizēm un mērījumiem atrodama iepriekšējās publikācijās (Andersone-Ozola et al., 2021a; Andersone-Ozola et al., 2021b; Ievinsh et al., 2021).



1. att. Baltijas jūras karte ar pētījumā izmantoto *T. fragiferum* atradņu vietām.

Fig. 1. Map of the Baltic Sea with indicated sites of *T. fragiferum* used in the study.

Ģenētiskajām analizēm DNS izdalīja no 11 populāciju 265 individuāliem augiem, izmantojot modificētu CTAB metodi (Porebski et al., 1997). Tika aprobēti 16 āboliņa marķieri: TPSSR09, TPSSR46, TPSSR13, TPSSR17, TPSSR34, TPSSR16, TPSSR44, TPSSR50, TPSSR29, TPSSR40 (Köllicker et al. 2006), RCS0883, RCS1928, RCS1225, RCS1897, RCS2667, RCS3666 (Haerinasab et al., 2020). Pēc marķieru genotipēšanas kvalitātes pārbaudes visus izdalītos DNS paraugus analizēja ar 10 mikrosatelītu marķieriem (TPSSR16, TPSSR17, TPSSR40, TPSSR50, RCS0883, RCS1928, RCS1225, RCS1897, RCS2667, RCS3666). Genotipēšanas datus analizēja ar GenAlEx 6.501 (Peakall, Smouse, 2012), Mega 4 (Tamura et al., 2007), Structure 2.3.4 (Pritchard et al., 2000) un Structure Harvester (Earl, von Holdt, 2012).

Rezultāti un diskusijas

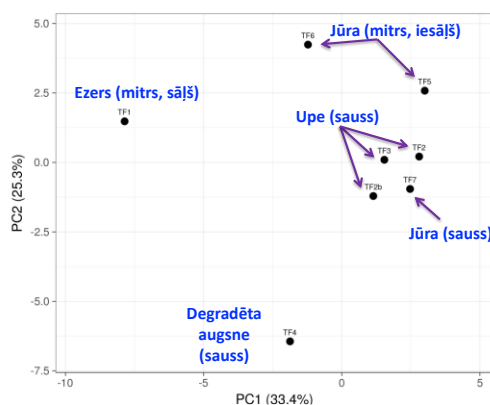
Augsnes apstākļu un minerālās barošanās atšķirības Latvijas atradnēs. Visas identificētās ģeogrāfiski izolētās *T. fragiferum* mikropopulācijas atradās tiešā ūdensbaseinu tuvumā (jūras, upes, ezera piekrastē), izņemot TF4 atradni Rīgas pilsētas degradētā teritorijā. Tikai TF1 atradnē *T. fragiferum* auga sālā augsnē, bet TF5 un TF6 – iesālā augsnē (1. tab.). Atradnes pārsvarā bija salīdzinoši nelielas, to laukums bija no dažiem simtiem m^2 (TB2, TB2b, TB4) līdz vairākiem tūkstošiem m^2 (TF1). Individu skaits atradnēs bija no apmēram 10 (TF2, TF3, TF7) līdz vairākiem tūkstošiem (TF1).

1. tabula / Table 1

Augsnes īpašības *T. fragiferum* Latvijas atradnēs
Soil characteristics at *T. fragiferum* Latvian sites

Atradne/Site	Augsnes mitrums, % / Soil moisture	Augsnes sāļums, mS cm ⁻¹ / Soil salinity	Na ⁺ koncentrācija, mg L ⁻¹ / Na ⁺ concentration	pH/pH
TF1	65.4 ± 5.4 a	8.94 ± 1.18 a	1114 ± 180 a	6.53 ± 0.43 d
TF2	8.94 ± 1.18 a	0.36 ± 0.06 c	57 ± 13 c	8.70 ± 0.2 a
TF2b	1114 ± 180 a	0.36 ± 0.09 c	44 ± 14 d	7.78 ± 0.13 abc
TF3	6.53 ± 0.43 d	0.60 ± 0.37 c	64 ± 4 c	6.78 ± 0.17 cd
TF4	26.9 ± 1.9 d	0.59 ± 0.05 c	65 ± 2 c	8.65 ± 0.09 ab
TF5	0.36 ± 0.06 c	2.18 ± 0.50 b	357 ± 87 b	7.70 ± 0.04 abc
TF6	57 ± 13 c	2.51 ± 0.71 b	484 ± 48 b	7.07 ± 0.17 cd
TF7	8.70 ± 0.2 a	0.21 ± 0.03 c	22 ± 2 e	7.35 ± 0.02 bcd

Augiem pieejamo augsnes minerālelementu koncentrācijas uzrādīja būtiskas atšķirības starp dažādām atradnēm un variēja no 59% N līdz 139% Ca gadījumā. Minerālelementu koncentrācijas apjoms augu lapu kātos un plātnēs variēja mazāk. Principiālo komponentu analīze atspoguļoja līdzību attiecībā uz augsnes īpašībām un minerālo barošanos starp mikropopulācijām sausos sāls neietekmētos biotopos upes un jūras piekrastē (2. att.). Pamatojoties uz šiem rezultātiem, *T. fragiferum* var raksturot kā sugu, kas spējīga uzturēt minerālvielu homeostāzi audos, pat augot substrātos ar krasi atšķirīgu pieejamo minerālvielu koncentrāciju, dažādu sāļumu un pH vērtībām.



2. att. Augsnes īpašību un minerālās barošanās līdzība starp *T. fragiferum* atradņu vietām.
 Fig. 2. Similarity of soil characteristics and mineral nutrition of *T. fragiferum* sites.

Atradņu atrašanās tiešā ūdens baseinu tuvumā norāda uz iespējamo sugas izplatīšanos pa ūdeni un saistību ar organisko sanesumu nogulsnešanos. Atšķirībā no citām āboliņu sugām *T. fragiferum* ir raksturīga ziedkopas (ziedgalvas) pārvēršanās par auglģalvu, kas sastāv no uzpūstām augļa kapsulām, veidotām no ziedkausa struktūrām pēc noziedēšanas (Zohary, Heller, 1982). Auglģalvas var nodrošināt sēklu izplatīšanās iespēju pa ūdeni, kas, domājams, notiek kopā ar fitodetrīta izplatīšanos (Wolters et al., 2017). Nevar izslēgt arī iespēju, ka kopā ar fitodetrītu izplatās arī augu stolonu fragmenti, kas var darboties kā veģetatīvās propagulas.

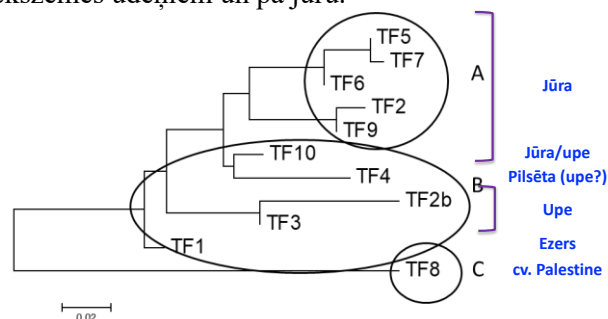
Izturība pret abiotiskajiem un antropogēnajiem faktoriem. Zemeņu āboliņa augiem no visām atsevišķajām Latvijas mikropopulācijām bija raksturīga salīdzinoši augsta izturība pret palielinātu augsnes mitrumu, nobradāšanu un nogriešanu, taču tiem konstatētas būtiskas atšķirības starp atsevišķām mikropopulācijām saistībā ar biomasas uzkrāšanos un fizioloģisko parametru izmaiņām šo faktoru ietekmē. TF1 kopumā uzrādīja vislielāko izturību. Visiem genotipiem bija augsta izturība pret palielinātu nebiogēno smago metālu Cd un Pb koncentrāciju augsnē, un to uzkrāšanos pārsvarā novēroja saknēs, turpretī dzinumos tā bija būtiski mazāka. Visi genotipi spēja augt un ģeneratīvi vairoties palielināta substrāta sāļuma apstākļos (līdz 5 g Na L⁻¹), taču tika novērotas būtiskas atšķirības, kas skar morfoloģiskos parametrus un biomasas veidošanos (3. att.). Paraugiem no

biotopiem ar augstāku sāļuma līmeni (TF1, TF9) bija augstāka relatīvā sālsizturība, taču TF9 bija būtiski mazāka biomasa jau kontroles apstākļos, tāpēc lielāku biomasu paaugstināta sāļuma apstākļos uzkrāja TF1 augi. Sāļuma ietekme uz minerālo barošanas raksturojuma kā specifiska genotipam, apliecinot, ka minerālvielu homeostāzes uzturēšana ir būtisks sālsizturības komponents.



3. att. Pieaugoša sāļuma ($\text{g Na}^+ \text{L}^{-1}$) ietekme uz *T. fragiferum* TF9 augu morfoloģiju.
Fig. 3. Effect of increasing salinity ($\text{g Na}^+ \text{L}^{-1}$) on morphology of *T. fragiferum* TF9 plants.

Ģenētiskās daudzveidības raksturojums. Izmantojot 10 mikrosatelītu marķierus, tika konstatēta vienādi zema ģenētiskā daudzveidība visās Latvijas populācijās, kā arī augiem no Dānijas un Igaunijas atradnēm, ko varētu izskaidrot ar populāciju ģeogrāfisko izolāciju un klonālās vairošanās raksturu. Ievērojami lielāka daudzveidība tika novērota cv. 'Palestine' sēklu materiālā. Populācijas bija ģenētiski diferencētas, ar savstarpējām F_{st} vērtībām virs 0.050, izņemot TF5/TF6 un TF5/TF7. Interesanti, ka ģenētiskā diferenciācija starp TF2 (Lielupes ieteka jūrā) un TF9 (Bornholmas sala Dānijā) populācijām bija visai neliela ($F_{st} = 0.069$), lai gan starp tām gaisa līnija sasniedz vairāk nekā 600 km. Populāciju savstarpējo ģenētisko distanču analīze sadalīja tās trīs grupās (4. att.). Pirmajā grupā bija visas jūras piekrastes populācijas, izņemot TF10 (Hāpsalu Igaunijā). Otrajā grupā ietilpa populācijas no upes un ezera krasta, kā arī TF10, bet cv. 'Palestine' veidoja atsevišķu grupu. Šie rezultāti apstiprina pieņēmumu par *T. fragiferum* izplatīšanos Ziemeļeiropā pēc pēdējā leduslaikmeta pa diviem ceļiem – pa iekšzemes ūdeņiem un pa jūru.



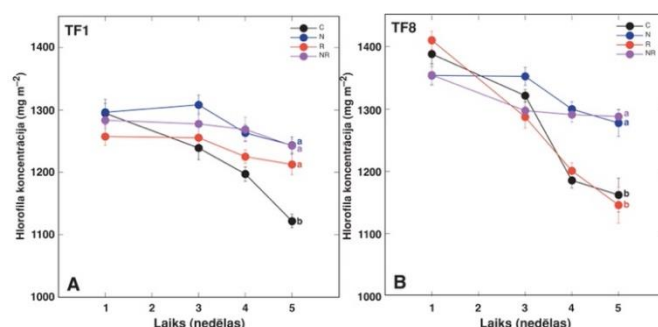
4. att. Ģenētiskā līdzība starp *T. fragiferum* populācijām.
Fig. 4. Genetic similarity between populations of *T. fragiferum*.

Simbiotiskās un slāpekļa atkarības raksturojums. Visu astoņu Latvijas atradņu *T. fragiferum* augiem un cv. 'Palestine' salīdzināja reakciju uz papildu slāpekli un inokulāciju ar natīvajām simbiotiskajām gumiņbaktērijām. Asimbiotiski kultivētiem minerālmēslojumu saņēmušiem *T. fragiferum* augiem pakāpeniski parādījās slāpekļa deficīta pazīmes, kas izpaudās kā lapu hlorofila koncentrācijas samazināšanās, lapu novecošanās, augšanas ātruma samazināšanās. Slāpekļa pievienošana, inokulācija ar natīvajām gumiņbaktērijām vai abu faktoru kompleksa ietekme būtiski novērsa šo simptomu rašanos (5. att.). Genotipi uzrādīja salīdzinoši līdzīgu atkarības pakāpi no slāpekļa (no 70 līdz 95% dzinumu sausās masas palielināšanās), bet dzinumu sausās masas pieaugums, inokulējot ar natīvajām gumiņbaktērijām, svārstījās no 27 līdz 85%. Vairākiem genotipiem (TF1, TF5, TF8) slāpekļa pievienošana jau simbiotiskiem augiem izraisīja papildu biomasas pieaugumu, bet tikai TF5 pozitīvi reaģēja uz papildu inokulāciju ar slāpekli apstrādātiem augiem. Gan lapu hlorofila koncentrācija, gan hlorofila *a* fluorescences parametrs PI bija labi rādītāji fizioloģiskā stāvokļa izmaiņām, ko izraisīja apstrāde ar slāpekli vai inokulācija ar gumiņbaktērijām (6. att.). Minerālvielu

koncentrācijas izmaiņas dažādās augu daļās bija atkarīgas no auga genotipa / gumiņbaktēriju kombinācijas.



5. att. Slāpekļa papildmēslojuma un gumiņbaktēriju ietekme uz *T. fragiferum* TF1 augu morfoloģiju.
Fig. 5. Effect on additional N fertilizer and rhizobia on morphology of *T. fragiferum* TF1 plants.



6. att. Slāpekļa papildmēslojuma (N), gumiņbaktēriju (R) un kopējās apstrādes (NR) ietekme uz *T. fragiferum* TF1 (A) un TF8 (B) augu lapu hlorofila koncentrācijas dinamiku.
Fig. 6. Effect on additional N fertilizer (N), rhizobia (R) and both treatments (NR) on time course of leaf chlorophyll concentration in leaves of *T. fragiferum* TF1 (A) and TF8 (B) plants.

Secinājumi

1. Pamatojoties uz minerālās barošanās adaptācijas spēju pielāgoties krasi atšķirīgiem augsnes apstākļiem un sālūmam, kā arī augu noturīgumu pret nelabvēlīgiem apstākļiem, *T. fragiferum* saglabāšanās potenciālu Latvijā var raksturot kā augstu, neraugoties uz esošo mikropopulāciju izolētību un ierobežoto lielumu.
2. Augiem no atsevišķām atradnēm ir lielāka izturība nekā cv. 'Palestine', kas apliecina, ka šie ģenētiskie paraugi ir izmantojami kā selekcijas materiāls jaunu lopbarības kultūru šķirņu veidošanai. Īpaši vērtīgs adaptīvā potenciāla ziņā ir genotips TF1 no Liepājas ezera piekrastes iesālās mitrās pļavas.
3. Novērotā ģenētiskā un fizioloģiskā daudzveidība liecina, ka ģeogrāfiski izolētās zemeņu āboliņa mikropopulācijas Latvijā pārstāv dažādus ekotipus un ir uzskatāmas par vērtīgu kultūraugu savvaļas radnieku bioloģisko resursu.

Pateicība. Pētījums veikts Latvijas Zinātnes padomes Fundamentālo un lietišķo pētījumu projekta lzp-2020/2-349 „Vērtīgas savvaļas tauriņziežu sugas *Trifolium fragiferum* Latvijas ģenētisko resursu molekulārs, fizioloģisks un ekoloģisks izvērtējums ilgspējīgas lauksaimniecības kontekstā” ietvaros. Paldies Magnolijai Garbarino, Lāsmi Neiceniecei, Līvai Purmalei un Mārim Romanovam par piedalīšanos pētījumā.

Izmantotā literatūra

1. Andersone-Ozola U., Jēkabsone A., Karlsons A., Romanovs M., Ievinsh G. (2021a). Soil chemical properties and mineral nutrition of Latvian accessions of *Trifolium fragiferum*, a crop wild relative plant species. *Environmental and Experimental Biology*, Vol. 19, p. 245–254.

2. Andersone-Ozola U., Jēkabsone A., Purmale L., Romanovs M., Ievinsh G. (2021b). Abiotic stress tolerance of coastal accessions of a promising forage legume species, *Trifolium fragiferum*. *Plants*, Vol. 10, 1552.
3. Bērziņa I., Zhuk A., Veinberga, I., Rashal I., Ruņģis, D. (2008). Genetic fingerprinting of Latvian red clover (*Trifolium pratense* L.) varieties using simple sequence repeat (SSR) markers: comparison over time and space. *Latvian Journal of Agronomy*, Vol. 11, p. 28–33.
4. Dabkevičienė G., Dabkevičius Z. (2005). Evaluation of wild red clover (*Trifolium pratense* L.) ecotypes and hybrid populations (*Trifolium pratense* L. × *Trifolium diffusum* Ehrh.) for clover rot resistance (*Sclerotinia trifoliorum* Erikss.). *Biologija*, Vol. 3, p. 54–58.
5. Dempewolf H., Eastwood R.J., Guarino L., Khoury C.K., Müller J.V., Toll J. (2014). Adapting agriculture to climate change: a global initiative to collect, conserve, and use crop wild relatives. *Agroecology and Sustainable Food Systems*, Vol. 38, p. 369–377.
6. Earl D.A., von Holdt B.M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, Vol. 4, p. 359–361.
7. Haerinasab M., Ali-Farsangi F., Bordbar F., Farouji A.E. (2020). Genetic diversity and infraspecific relationships of *Trifolium fragiferum* L. in Iran. *Iranian Journal of Science and Transactions A: Science*, Vol. 44, p. 345–354.
8. Ievinsh G., Karlsons A., Jēkabsone A., Andersone-Ozola U. (2021). Heavy metal tolerance and accumulation potential of coastal accessions of *Trifolium fragiferum*, a promising forage species. **In: Proceedings of the 10th International Scientific Conference Rural Development 2021.** Vytautas Magnus University Agriculture Academy, pp. 214–219.
9. Kolliker R., Enkerli J., Widmer F. (2006). Characterization of novel microsatellite loci for red clover (*Trifolium pratense* L.) from enriched genomic libraries. *Molecular Ecology Notes*, Vol. 6, p. 50–53.
10. Lemežienė N., Stukonis V., Kemešytė V., Norkevičienė E. (2018). Wild and semi natural ecotypes of perennial grasses and legumes – for breeding purposes. **In: Breeding Grasses and Protein Crops in the Era of Genomics.** Brazauskas G. et al. (Eds.). Springer International Publishing AG; pp. 88–95.
11. Nichols P.G.H., Revell C.K., Humphries A.W., Howie J.H., Hall E.J., Sandral G.A., Ghamkhar K., Harris C.A. (2012). Temperate pasture legumes in Australia—their history, current use, and future prospects. *Crop and Pasture Science*, Vol. 63, p. 691–725.
12. Paplauskienė V., Dabkevičienė G. (2012). A study of genetic diversity in *Trifolium hybridum* varieties using morphological characters and ISSR markers. *Žemdirbystė=Agriculture*, Vol. 99, p. 313–318.
13. Peakall R., Smouse P.E. (2012). GenALEX 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics*, Vol. 28, p. 2537–2539.
14. Porebski S., Bailey L.G., Baum B.R. (1997). Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter*, Vol. 5, p. 8–15.
15. Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, Vol. 155, p. 945–959.
16. Rancane S., Jansone B., Sparnina M. (2006). The evaluation of genetic resources of forage legumes collected from natural grassland. **In: Proceedings of the 21st General Meeting of the European Grassland Federation: Sustainable Grassland Productivity**, Badajoz, Spain, 3–6 April 2006, pp. 327–329.
17. Rūsiņa S. 2013. 1630* Boreal Baltic coastal meadows. **In: Auniņš A. (Ed.) European Union Protected Habitats in Latvia. Interpretation Manual.** Riga, Latvian Fund for Nature, Ministry of Environmental Protection and Regional Development, pp. 55–57.
18. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, Vol. 24, p. 1596–1599.
19. Townsend C.E. (1985). Miscellaneous perennial clovers. **In: Clover Science and Technology.** Taylor J.L. (Ed.). ASA/CSSA/SSSA, Madison, Wisconsin, pp. 563–578.

20. Wolters M., de Vries S., Ozinga W., Bakker J.P. (2017). Restoration of inland brakish vegetation by large-scale transfer of coastal driftline material. *Applied Vegetation Science*, Vol. 20, p. 641–650.
21. Zhang H., Yasmin F., Song B.-H. (2019). Neglected treasures in the wild — legume wild relatives in food security and human health. *Current Opinion in Plant Biology*, Vol. 49, p. 17–26.
22. Zohary M., Heller D. (1984). *The Genus Trifolium*. Israel Academy of Sciences and Humanities. 606 p.