Ghahremaninejad, F., Khalili, Z., Maassoumi, A. A., Mirzaie-Nodoushan, H. and Riahi, M. (2012) Leaf epidermal features of *Salix* species (Salicaceae) and their systematic significance. American Journal of Botany 99(4): 769-777.

Kauff, F., Rudall, P. J. and Conran, J. G. (2000) Systematic root anatomy of Asparagales and other monocotyledons. Plant Systematics and Evolution 223: 139-154.

Miryeganeh, M. and Movafeghi, A. (2009) Scape anatomy of *Allium* sect. *Allium* (Alliaceae) in Iran. Journal of Science and Technology 35: 1-5.

Rahn, K. (1998) *Allium* L. in: Kubitzki, K. (ed.) The families and genera of vascular plants, Vol. 3. Berlin, Springer-Verlag. pp. 70-76.

Takhtajan, A. (1997) Diversity and classification of flowering plants, New York: Columbia University Press.

Wendelbo, P. (1971) Alliaceae. In: Flora Iranica (ed. Rechinger K. H.) vol. 76: 1-100. Akadeische Druck- U Veragsanstalt, Graz.

Yousaf, Z., Shinwari, Z. Kh., Asghar, R. and Parvin, A. (2008) Leaf epidermal anatomy of selected *Allium* species, family Alliaceae from Pakistan. Pakistan Journal of Botany 40: 77-9

تعیین فاصله‌ژنتیکی برخی ارقام لوبیا (*Phaseolus vulgaris*) با استفاده از الکتروفورز یک بعدی

تاریخ دریافت:۹۳/۰۹/۰۵
تاریخ تصویب: ۹۵/۰۷/۰۵

مهدی کاکایی[1*]

چکیده

مواد ژنتیکی متفاوت گیاهی، ذخایر بالقوه‌ای هستند که به عنوان پشتوانه‌ای ارزشمند برای متخصصین اصلاح‌نباتات به شمار می‌روند. مطالعه پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر به دلیل این‌که کمتر تحت اثر محیط قرار می‌گیرند، اطلاعات قابل اعتمادی از تنوع‌ژنتیکی ژنوم لوبیا را در اختیار قرار می‌دهند. در این مطالعه تفکیک پروتئین‌های بذر ۱۲ ژنوتیپ لوبیا بر اساس روش لاملی با کمک سیستم الکتروفورز ژل‌پلی‌اکریل‌آمید ۱۲/۵ درصد آنالیز گردید. بررسی باندها با برنامه NTSYS تفاوت‌های درخور توجهی را نشان دادند. کمترین تعداد باند مربوط به رقم شماره ۱۱ و بیشترین تعداد باند مربوط به رقم شماره ۱۲ بود. ضریب کوفنتیک محاسبه شده جهت آزمون برازش دندروگرام با داده‌های کیفی ۰/۸۹ بدست آمد که نشان‌دهنده برازش مناسب و مطلوب دندروگرام با داده‌های کیفی می‌باشد. نمودار حاصل از تجزیه به محورهای اصلی بر اساس پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر لوبیا، دندروگرام پنج خوشه‌ای را مورد تأیید و انطباق قرار داد. بنابراین، با توجه به فواصل ژنوتیپ‌ها نسبت به هم، در برنامه‌های اصلاحی جهت بدست آوردن بالاترین هتروزیس، تلاقی

۱-استادیار دانشگاه پیام‌نور، گروه مهندسی کشاورزی (اصلاح‌نباتات و ژنتیک)، صندوق پستی ٤٦٩٧-١٩٣٩٥، تهران-ایران.
(نویسنده مسئول : Mehdikakaei37@gmail.com)

ژنوتیپ‌های Ks ۲۱۱۹۳ و شکوفا قابل توجیه می‌باشد. به ترتیب بیشترین و کمترین مقدار پروتئین کل مربوط به ژنوتیپ‌های درسا و شکوفا بود.

واژه‌های کلیدی: الگوی پروتئینی، پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر، تنوع‌ژنتیکی، لوبیا، SDS-PAGE

مقدمه

لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.) با حدود ۲۲ درصد پروتئین، سطح زیر کشت ۱۰۹ هزار هکتار و تولید سالانه ۱۸۰ هزار تن از نظر سطح زیر کشت حبوبات کشور پس از نخود و عدس و از نظر میزان تولید بعد از نخود قرار دارد(Anonymous, 2000). تنوع و انتخاب، دو رکن اصلی هر برنامه به‌نژادی بوده و انجام انتخاب منوط به وجود تنوع مطلوب از حیث هدف مورد بررسی می‌باشد (نارویی راد و همکاران، ۱۳۸۵). وجود تنوع‌ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها یک عامل خوب در جهت کاهش آسیب‌پذیری ژنتیکی و کشاورزی پایدار است (رجبی‌هشجین و همکاران، ۱۳۹۲). در واقع به‌نژادی بر پایه‌ی تنوع و گزینش بنا نهاده شده و تنوع‌ژنتیکی حوزه فعالیت و انتخاب اصلاح‌گر را برای گزینش و دیگر عملیات اصلاحی افزایش می‌دهد. کسب اطلاع از فاصله ژنتیکی بین افراد یا جمعیت‌ها و آگاهی از روابط خویشاوندی گونه‌های مورد نظر در برنامه اصلاحی، امکان سازماندهی ذخایر توارثی و نمونه‌گیری مؤثر از ژنوتیپ‌ها و بهره‌برداری بهتر از تنوع در برنامه‌های اصلاحی را فراهم می‌سازد(Sharma et al., 2002). به همین منظور از نشانگرهای مختلفی مانند نشانگرهای مورفولوژیکی (براساس صفات ظاهری گیاه)، ملکولی (مبتنی بر DNA و پروتئین) و سیتوژنتیکی استفاده می‌شود (Li and Nelson, 2002). نشانگرهای مورفولوژیکی که نتیجه جهش‌های قابل رؤیت در مورفولوژی سیستم‌های زنده می‌باشند از اوایل قرن بیستم مورد استفاده بوده‌اند ولی در اصلاح‌نباتات استفاده از نشانگرهای بیوشیمیایی همچون پروتئین‌ها حدوداً از ٤٠ سال قبل رایج گردید (ابوذری‌گزافرودی و همکاران، ۱۳۸۵). در واقع روش‌های کلاسیک اندازه‌گیری تنوع در میان گروه‌های مختلف گیاهی عمدتاً مبتنی برخصوصیات ظاهری بوده که طی آن گیاهان مورد مطالعه بر اساس یک‌سری تفاوت‌های قابل بیان در صفات قابل رؤیت امتیازبندی می‌شوند (Newbury et al., 1997). بسیاری از محققان پس از بررسی و مقایسه صفات مرفولوژیک،فنولوژیک، فیزیولوژیک، ملکولی، مشخصات جغرافیائی و تعیین میزان تنوع

ژنتیکی اقدام به شناسایی و دسته‌بندی آن‌ها کرده‌اند (Garcia et al., 1998). پروتئین‌ها، محصولات نهایی مسیرهای ژنتیکی هستند که در مراحل مختلف حیات سلول و در پاسخ به نیازهای سلولی تولید و به سوی جایگاه‌های مناسب هدف‌گیری می‌شوند (Nelson and Cox, 2007). پس از ابداع نشانگرهای مولکولی و توسعه آن‌ها در دهه‌های اخیر انتخاب در بین لاین ها نتاج حاصل از تلاقی‌ها با استفاده از نشانگرهای مولکولی در برنامه‌های به‌نژادی فراگیر شده است، در این میان استفاده از نشانگرهای پروتئینی برای مطالعه تنوع‌ژنتیکی به دلیل ارزان بودن و در دسترس بودن تمامی امکانات مورد نیاز آن بسیار رواج دارد (رجبی هشجین و همکاران، ۱۳۹۲؛ کاکایی و همکاران، ۱۳۹۱). رستمی و رضوی‌زاده (۱۳۹۲) از الگوی الکتروفورزی SDS-PAGE در بررسی تنوع ژنتیکی برخی ارقام کلزا استفاده نمودند و شباهت و اختلاف بین ژنوتیپ‌ها را تعیین نمودند. کاکایی و همکاران (۱۳۹۱) الگوی پروتئینی بذر و برگ ارقام نخود را مطالعه نمودند و تنوع آن‌ها را نشان دادند. رجبی‌هشجین و همکاران (۱۳۹۲) در بررسی تنوع آللی پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر در گندم‌های دوروم، مواد آزمایشی را در نه گروه دسته‌بندی نمودند. اکثر صفات زیستی که دارای اهمیت اقتصادی فراوانی هستند به صورت کمی به ارث می‌رسند، این صفات وراثت‌پذیری نسبتاً پایینی را دارا هستند و گزینش مستقیم در مزرعه با مشکلاتی همراه می‌باشد بنابراین انجام عملیات اصلاحی در ارتباط با این صفات دشوار است (بهی و همکاران، ۱۳۹۲). تاکنون بررسی‌های گیاه‌شناسان نشان داده است که افراد متعلق به یک گونه گیاهی کاملاً مشابه یکدیگر نیستند. لینه این تنوعات را در رابطه با اثر محیط و عوامل محیطی تفسیر می‌کرد که به دو صورت تنوع‌ژنتیکی و فنوتیپی ظهور می‌یابد (معصومی و همکاران، ۱۳۹۰). به‌نژادگران از نشانگرهای بیوشیمیایی و ژنتیکی که با صفات کمی پیوسته ارتباط داشته باشند به عنوان معیارهای گزینش غیرمستقیم استفاده می‌کنند. مطالعه تنوع آللی و تعیین فاصله ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها، هدف این تحقیق را تشکیل دادند.

جدول ۱: اسامی ژنوتیپ‌های لوبیای مورد مطالعه در این تحقیق

ردیف	نام ژنوتیپ	ردیف	نام ژنوتیپ	ردیف	نام ژنوتیپ	ردیف	نام ژنوتیپ
۱	*Ks*۲۱۱۹۳	۴	صدری	۷	گلی	۱۰	اختر
۲	پاک	۵	محلی‌خمین	۸	درسا	۱۱	شکوفا
۳	دانشکده	۶	*Cos*-۱۶	۹	*Ks-z*۱۱۸۹	۱۲	*DF*-۱۰۸۳

مواد و روش‌ها

بذر ۱۲ ژنوتیپ (جدول ۱) لوبیا از مرکز تحقیقات حبوبات خمین تهیه گردید. بذور بالغ هر ژنوتیپ جهت پودر شدن آماده شد.

استخراج پروتئین آندوسپرم بذور ژنوتیپ‌های لوبیا مورد مطالعه ابتدا آندوسپرم و جنین از بذر ژنوتیپ‌های مورد مطالعه تفکیک شد سپس نمونه ۲۵۰ میلی‌گرمی از بذر ژنوتیپ‌ها در داخل هاون چینی کوبیده و پودر شد. پروتئین آندوسپرم پودر شده درون میکروتیوب‌های دو میلی‌لیتری قرار داده شد و از بافر استخراج پروتئین روش Yang et al., (2006) با اندکی تغییرات پر و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سلسیوس با دور g13500 سانتریفیوژ گردید. سپس محلول رویی در دو میکروتیوب توزیع گردید و با محلول TCA (Tricolor Acetic Acid)-Acetone پر شد و به مدت یک ساعت در فریزر باقی ماند. سپس در دمای *4* درجه سلسیوس با دور g13500 به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از ته‌نشین شدن پروتئین، محلول رویی دور ریخته شد و با استون سه بار شستشو صورت پذیرفت و با بافر لیزکننده به میزان ۱۵۰میکرولیتر مخلوط گردید، سپس به مدت یک ساعت شیک گردید و با روش Bradford (۱۹۷٦)، در محدوده ۵۹۵ نانومتر جذب نمونه‌ها قرائت گردید.

سنجش پروتئین کل و الکتروفورز پروتئین آندوسپرم استخراجی (SDS-PAGE)

اندازه‌گیری پروتئین کل بر اساس روش تغییر یافته برادفورد (۱۹۷٦)، با استفاده از آلبومین سرم گاوی به عنوان پروتئین استاندارد انجام و پس از یکسان سازی نمونه‌ها، الگوی الکتروفورزی (SDS-PAGE) پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر انجام گردید. SDS-PAGE در ژل جدا کننده ۱۲/۵ درصد و ژل متراکم کننده ۵ درصد، به روش لاملی با برخی تغییرات انجام پذیرفت. ابتدا مقدار پروتئین نمونه‌ها به روش فوق تعیین و سپس مقدار ۱۵ میکرولیتر از هر نمونه با غلظت یکسان روی ژل بارگذاری گردید. از پروتئین‌های اوترانسفرین (۷۸ کیلودالتون)، آلبومین گاوی (٦٦ کیلودالتون)، اوآلبومین (٤٥ کیلودالتون)، اکتینیدین (۲۹ کیلودالتون)، بتا-لاکتوگلوبولین (۱۸ کیلودالتون) و لیزوزیم (١٤ کیلودالتون) به عنوان نشانگر در ژل استفاده گردید. الکتروفورز با ولتاژ ۵۰ ولت در ژل متراکم کننده به مدت نیم ساعت و ولتاژ ۱۵۰ ولت در ژل جدا کننده به مدت یک‌ونیم ساعت تا رسیدن نشانه رنگی به پایین ژل با دستگاه پاورساپلای (منبع تغذیه) انجام گردید.

رنگ‌آمیزی ژل پلی‌اکریل‌آمید

بعداز الکتروفورز، رنگ‌آمیزی با کوماسی بلو بریلیانت 250-R انجام شد. پس از یک‌ونیم ساعت قرار گرفتن در محلول

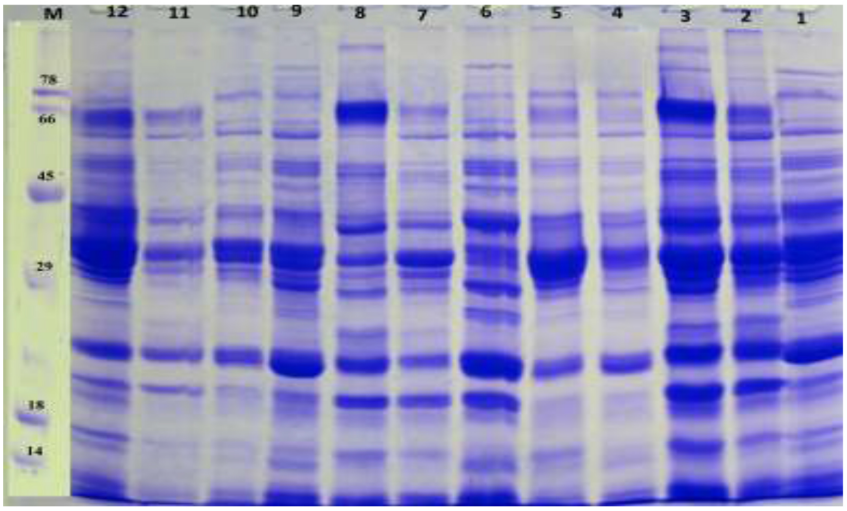
رنگ، با محلول رنگ بر (متانول (100cc)، اسیداستیک گلاسیال (50cc) و آب مقطر (350cc) تا روشن شدن زمینه ژل ادامه یافت و سپس ژل اسکن شد.

رتبه‌بندی و تجزیه آماری داده‌ها

باندها بر اساس حضور و عدم حضور در هر نمونه امتیازدهی شدند. ماتریس دو طرفه ژنوتیپ‌ها و متغیرها بر اساس صفر و یک تشکیل گردید سپس آنالیز داده‌ها با کمک نرم‌افزار 2.02e NTSYS-pc Version انجام گرفت. تجزیه خوشه‌ای بر اساس ضریب تشابه جاکارد صورت گرفت و در نهایت بر اساس روش UPGMA ترسیم گردید. جهت آزمون برازش مناسب دندروگرام با داده‌های کیفی، ضریب کوفنتیک محاسبه شد. تجزیه به مختصات اصلی (Principal Coordinate Analysis) نیز برای توصیف بهتر روابط ژنتیکی ژنوتیپ‌های لوبیا استفاده گردید.

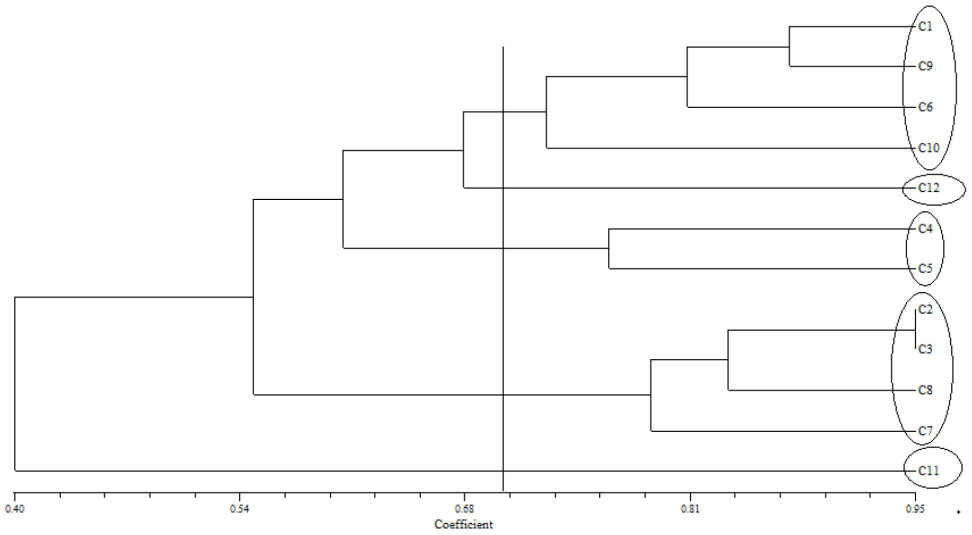
نتایج

بررسی نتایج حاصل از مطالعات الکتروفورزی پروتئین‌های بذر نیز وجود تنوع درون گونه‌ای را نشان می‌دهد. وجود تنوع‌ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها یک عامل خوب در جهت کاهش آسیب‌پذیری ژنتیکی و تولید پایدار است (رجبی‌هشجین و همکاران، ۱۳۹۲). مطالعه پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر لوبیا به این دلیل که کمتر تحت اثر محیط است می‌تواند اطلاعات درست و قابل اعتمادی از تنوع‌ژنتیکی ژنوم لوبیا در اختیار ما قرار دهد. الگوی الکتروفورزی تعدادی از ژنوتیپ‌های لوبیا مورد ارزیابی در شکل ۱ نمایش داده شده است. بررسی الگوی پروتئینی بذر ژنوتیپ¬های لوبیا با کمک SDS-PAGE و آنالیز باندهای پروتئینی با کمک نرم افزار NTSYS، تفاوت معنی‌دار در بیان پروتئین ها را مشخص ساخت. به هر یک از ژنوتیپ‌ها بر اساس وجود یا عدم وجود هر آلل، امتیاز صفر و یک داده شد و تجزیه خوشه¬ای به روش UPGMA ژنوتیپ‌ها را در پنج گروه تقسیم‌بندی نمود. با توجه به منابع متعدد اطلاعات دقیق و کامل در مورد پتانسیل ژنتیکی نمونه‌های موجود از نظر نشانگر مورد بررسی نبوده است. این نتایج می‌تواند کمک شایانی در جهت تکمیل اطلاعات در مورد پتانسیل ژنتیکی و تصمیم‌گیری صحیح در جهت حفاظت تنوع‌ژنتیکی بالای این ژنوتیپ‌ها به بانک ژن ملی گیاهی بنمایند. علاوه بر این شناساگرهای پروتئینی با هدف بررسی روابط تاکسونومیکی و تشخیص واریته‌های تحت کشت برخی گونه‌های گیاهان زراعی مهم، قابل توجه هستند (رضوی‌زاده و رستمی، ۱۳۹٤).



شکل ۱: الگوی باندهای پروتئینی تشکیل شده حاصل از الکتروفورز پروتئین‌های آندوسپرم بذر ژنوتیپ‌های لوبیا (اسامی ژنوتیپ‌ها بر اساس شماره از ۱ تا ۱۲ مطابق جدول ۱) (اسامی نشانگرها و وزن ملکولی آن‌ها به ترتیب از بالا به پایین اوترانسفرین (۷۸ کیلودالتون)، آلبومین گاوی (٦٦ کیلودالتون)، اوآلبومین (٤٥ کیلودالتون)، اکتینیدین (۲۹ کیلودالتون)، بتا-لاکتوگلوبولین (۱۸ کیلودالتون) و لیزوزیم (١٤ کیلودالتون).

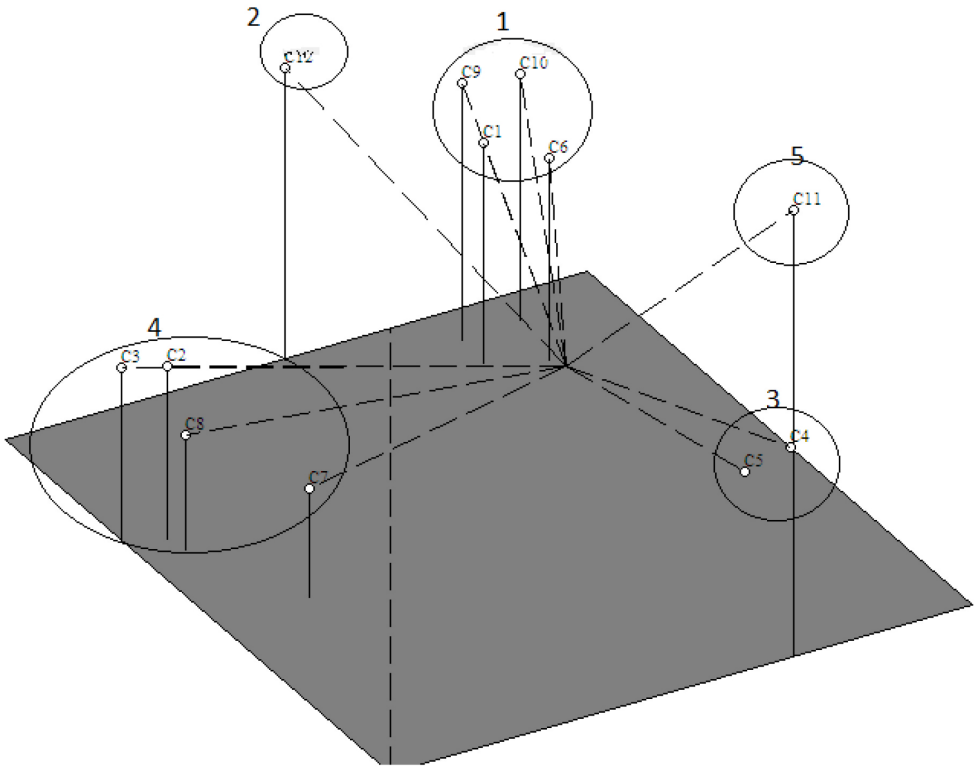
دندروگرام شکل ۲، بررسی روابط خویشاوندی بر اساس باندهای پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر ژنوتیپ‌های لوبیا را نمایش می دهد. خط برش در مقیاس ۰/۷۱ ژنوتیپ ها را در پنج گروه دسته‌بندی کرد که ژنوتیپ های شماره ۱ (Ks21193)، ٦ (16-Cos)، ۹ (Ks-z1189) و ۱۰ (اختر) در گروه اول، ژنوتیپ شماره ۱۲ (1083-DF) در گروه دوم، ژنوتیپ های شماره ٤ (صدری) و ٥ (محلی خمین) در گروه سوم، ژنوتیپ های شماره ۲ (پاک)، ۳ (دانشکده)، ۷ (گلی) و ۸ (درسا) در گروه چهارم و ژنوتیپ شماره ۱۱ (شکوفا) در گروه پنجم قرار گرفتند. نتایج حاصل از بررسی روابط خویشاوندی بر پایه حضور یا عدم حضور باندهای پروتئینی خاص در ژل مربوط به دانه نشان داد که ژنوتیپ های شماره ۱ (Ks21193) و ۱۱ (شکوفا) نسبت به هم دارای بیشترین فاصله ژنتیکی می باشند که می توان جهت اهداف به نژادی آتی از آن استفاده نمود. ریاست و نصیرزاده (۱۳۸۳) در مطالعه تنوع ژنتیکی پروتئین های بذر شنبلیله به کمک الکتروفورز تک بعدی ١٦ باند پروتئینی را تشخیص داد و ژنوتیپ های مورد مطالعه را خوشه بندی نمودند.



شکل ۲: داده های الکتروفورزی حاصل از تحلیل داده های الکتروفورزی بر اساس باندهای پروتئین های ذخیره ای بذر ژنوتیپ های لوبیا با روش UPGMA با نرم افزار NTSYS-pc. (گروه بندی در سطح فاصله ۷۱/۰ انجام گردید.) اعداد ۱ تا ۱۲ شماره ژنوتیپ های لوبیا مطابق با جدول ۱ است. (C1=Ks21193، پاک =C2، دانشکده =C3، صدری =C4، محلی‌خمین =C5، Cos-16 =C6، گلی =C7، درسا =Ks-z1189 C9 =C8، اختر =C10، شکوفا DF-1083 =C11، C12=).

شکل شماره ۳، نمودار حاصل از تجزیه به محورهای اصلی بر اساس پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر لوبیا را نشان می دهد که انطباق بالای پراکنش ژنوتیپ‌ها بر اساس تجزیه به محورهای اصلی با این گروه‌بندی فوق را نشان می دهد. تجزیه مختصات اصلی (Principal Coordinate Analysis) حالت تعمیم یافته ای از تجزیه مؤلفه های اصلی است که در آن از شباهت بین افراد استفاده می کند، هدف از این تجزیه ساخت پلات های گرافیکی با ابعاد کمتر از داده ها است (اسماعیلی و همکاران، ۱۳۹۲). بنابراین هر ژنوتیپ توسط نقطه ای در فضای اقلیدسی نمایش داده می شود و ژنوتیپ-هایی که شباهت بیشتری به یکدیگر دارند مجاور یکدیگر قرار می گیرند (فرشادفر، ۱۳۸۰). معصومی و همکاران (۱۳۹۰) در مطالعه گونه های زیره سبز از نمودار تجزیه به محورهای اصلی بر اساس پروتئین های ذخیره ای بذور زیره استفاده نموده و انطباق بالای آن را با دندروگرام گزارش نمودند. در این مطالعه ژنوتیپ شماره ۱۲ (DF-۱۰۸۳) و ۱۱ (شکوفا) هر کدام در ناحیه ی مجزا قرار دارند که در تجزیه ی خوشه ای نیز این ژنوتیپ ها در خوشه های مجزا قرار گرفته اند. ژنوتیپ های شماره ٤ (صدری) و ٥ (محلی خمین) هم در ناحیه ی متمایز از سایر ژنوتیپ ها قرار دارند. ژنوتیپ های شماره ۱ (Ks21193)، ٦ (Cos-16)، ۹ (Ks-

z1189) و ۱۰ (اختر) در ناحیه نزدیک بهم قرار دارند و ژنوتیپ-های شماره ۲ (پاک)، ۳ (دانشکده)، ۷ (گلی) و ۸ (درسا) در کنار هم قرار دارند. این نتایج همسو با نتایج حاصل از تجزیه خوشه ای می باشد. صالحی و همکاران (۱۳۹۲) نتایج حاصل از تنوع بین گونه ای در دو گونه بومادران در ۲۱ زیستگاه با روش FCA را از نظر ترکیب فلوریستیک در دو گروه (در فضای بای پلات) از همدیگر تفکیک نمودند.



شکل ۳: نمودار حاصل از تجزیه به محورهای اصلی بر اساس پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر لوبیا. اعداد ۱ تا ۱۲ شماره ژنوتیپ-های لوبیا که مطابق با جدول ۱ نیز است (C1=Ks21193، پاک =C2، دانشکده =C3، صدری =C4، محلی‌خمین Cos-16=C5، =C6، گلی =C7، درسا C9 Ks-z1189 =C8، اختر =C10، شکوفا DF- C11= ، C12= 1083).

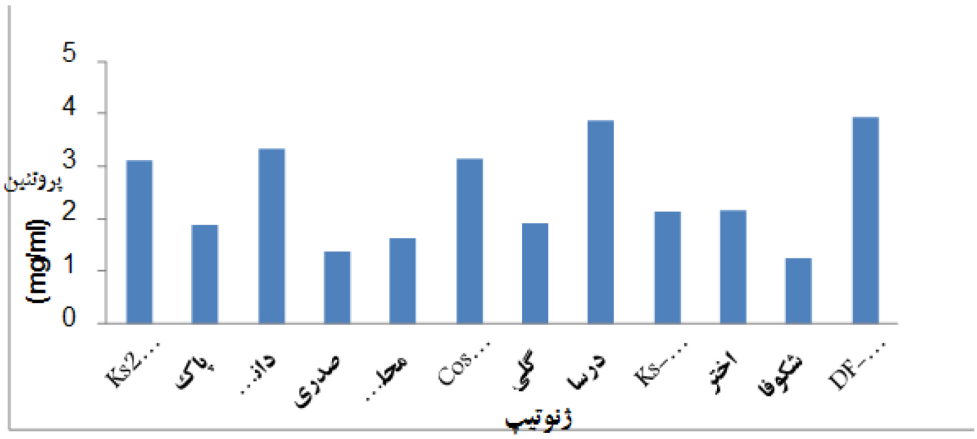
امتیازدهی نوارهای پروتئینی ۱۲ ژنوتیپ لوبیا در جدول شماره ۲ مشاهده می گردد. نوار شماره هفت در تمام ژنوتیپ ها مشترک است که نشان دهنده پروتئین یکسان در تمامی ژنوتیپ ها می باشد که احتمالاً پروتئین اختصاصی جنس *Phasaeolous* می باشد. نوارهای شماره ۹، ۱۱، ۱۷، ۱۹ و ۲۵ همه با اختلاف یک باند می توانند پروتئین های اختصاصی باشند. جدول شماره ۳ ماتریس تشابه جاکارد بر اساس نشانگر پروتئینی ژنوتیپ های لوبیای مورد مطالعه را

نمایش می دهد. تشابه ژنتیکی ژنوتیپ ها با استفاده از نشانگر پروتئینی و بر اساس ضریب تشابه جاکارد از ۰/۴۰۱ تا ۱ متغیر بود. طبق ماتریس تشابه بر اساس ضریب تشابه جاکارد نشانگر پروتئینی (جدول ۳) بیشترین شباهت ژنتیکی بین ژنوتیپ های دانشکده با پاک (۰/۹۵۲)، دانشکده با درسا (۰/۸۳۷)، Cos-۱۶ با KS-Z۱۱۸۹ (۰/۸۱۲)، Cos-۱۶ با Ks۲۱۱۹۳ (۰/۸۱۲) و KS-Z۱۱۸۹ با KS۲۱۱۹۳ (۰/۸۷۵) می باشد.

جدول ۲: داده های الکتروفورزی SDS-PAGE در ژنوتیپ های مورد مطالعه

کد ژنوتیپ شماره نوار	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲
۱	۰	۱	۱	۰	۰	۰	۰	۱	۰	۰	۰	۱
۲	۱	۱	۱	۰	۰	۱	۰	۱	۱	۱	۰	۱
۳	۱	۱	۱	۱	۰	۱	۰	۰	۱	۱	۰	۱
۴	۱	۰	۰	۱	۱	۱	۰	۰	۱	۱	۰	۱
۵	۰	۱	۱	۰	۱	۰	۱	۱	۰	۰	۱	۱
۶	۱	۱	۰	۱	۱	۱	۱	۰	۱	۱	۱	۰
۷	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۸	۱	۰	۰	۱	۱	۱	۰	۰	۱	۱	۱	۱
۹	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۱	۱
۱۰	۱	۰	۰	۱	۱	۱	۰	۱	۱	۱	۱	۱
۱۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۱
۱۲	۰	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۰	۱
۱۳	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۱	۱	۱	۱	۰	۱
۱۴	۱	۱	۱	۰	۰	۰	۱	۱	۱	۱	۰	۱
۱۵	۱	۱	۱	۰	۰	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۱
۱۶	۱	۱	۱	۰	۰	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۱
۱۷	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۱	۱
۱۸	۰	۰	۰	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۱	۱
۱۹	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۱	۱	۱	۱
۲۰	۱	۱	۱	۰	۰	۰	۱	۱	۱	۱	۰	۱
۲۱	۱	۰	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۱	۱
۲۲	۰	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۱	۰	۰	۱
۲۳	۱	۱	۱	۰	۱	۰	۱	۱	۱	۱	۰	۱
۲۴	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۱
۲۵	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰
۲۶	۱	۱	۱	۰	۰	۰	۱	۰	۱	۱	۰	۱
۲۷	۱	۱	۱	۰	۰	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰
۲۸	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۰	۱	۱	۰	۱
۲۹	۰	۱	۱	۰	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۱
۳۰	۱	۱	۱	۰	۰	۰	۱	۰	۱	۱	۰	۱

شکل ٤، نمودار پروتئین کل ژنوتیپ های مورد مطالعه لوبیا را نشان می دهد. همان طوری که مشخص می باشد بین ژنوتیپ های مورد مطالعه از نظر محتوای پروتئینی اختلاف وجود دارد به ترتیب بیشترین مقدار پروتئین مربوط به ژنوتیپ درسا و ژنوتیپ DF-1083 بود و کمترین مقدار آن مربوط به ژنوتیپ شکوفا می باشد.



شکل٤: نمودار پروتئین محلول کل، ژنوتیپ های مورد مطالعه لوبیا

اسامی ژنوتیپ‌ها به ترتیب از راست به چپ (1=Ks21193، پاک =2، دانشکده =3، صدری =4، محلی‌خمین= 5، Cos- 16=6 ، گلی =7 ، درسا =9 Ks-z1189 ،8=، اختر =10، شکوفا ، =11 DF-1083 12=).

جدول ۳: ماتریس تشابه جاکارد بر اساس نشانگر پروتئینی ژنوتیپ های لوبیای مورد مطالعه

	*Ks*۲۱۱۹۳	پاک	دانشکده	صدری	محلی خمین	*Cos*-۱۶	گلی	درسا	*Ks*-z۱۱۸۹	اختر	شکوفا	*DF*-۱۰۸۳
*Ks*۲۱۱۹۳	۱											
پاک	۰/۵۴۶	۱										
دانشکده	۰/۵۴۶	۰/۹۵۲	۱									
صدری	۰/۶۰۱	۰/۵۴۶	۰/۵۴۶	۱								
محلی خمین	۰/۶۰۱	۰/۵۴۶	۰/۵۴۶	۰/۷۶۴	۱							
Cos-۱۶	۰/۸۱۲	۰/۵۴۶	۰/۵۴۶	۰/۶۰۱	۰/۶۰۱	۱						
گلی	۰/۵۴۶	۰/۷۹۰	۰/۷۹۰	۰/۵۴۶	۰/۵۴۶	۰/۵۴۶	۱					
درسا	۰/۵۴۶	۰/۸۳۷	۰/۸۳۷	۰/۵۴۶	۰/۵۴۶	۰/۵۴۶	۰/۷۹۰	۱				
Ks-z۱۱۸۹	۰/۸۷۵	۰/۵۴۶	۰/۵۴۶	۰/۶۰۱	۰/۶۰۱	۰/۸۱۲	۰/۵۴۶	۰/۵۴۶	۱			
اختر	۰/۷۲۶	۰/۵۴۶	۰/۵۴۶	۰/۶۰۱	۰/۶۰۱	۰/۷۲۶	۰/۵۴۶	۰/۵۴۶	۰/۷۲۶	۱		
شکوفا	۰/۴۰۱	۰/۴۰۱	۰/۴۰۱	۰/۴۰۱	۰/۴۰۱	۰/۴۰۱	۰/۴۰۱	۰/۴۰۱	۰/۴۰۱	۰/۴۰۱	۱	
DF-۱۰۸۳	۰/۶۷۵	۰/۵۴۶	۰/۵۴۶	۰/۶۰۱	۰/۶۰۱	۰/۶۰۱	۰/۵۴۶	۰/۵۴۶	۰/۶۷۵	۰/۶۷۵	۰/۴۰۱	۱

بحث

در این مطالعه، روش الکتروفورز قادر به جداسازی کامل ژنوتیپ ها از یکدیگر بود و نتایج ارزنده ای نیز در زمینه اوزان ملکولی پروتئین های ذخیره ای بذر گونه های مورد بررسی به دست آمد که نشان می دهد این روش می تواند ابزاری مفید برای تفکیک و جدایی ژنوتیپ ها در

سطح گونه باشد. این نتایج از آن جهت مفید و مهم است که در زمینه الکتروفورز بذر ژنوتیپ های مورد مطالعه تاکنون گزارشی صورت نپذیرفته است. با توجه به این که پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر در طی فرایند تکامل تا حد بسیار زیادی حفاظت شده‌اند، لذا الکتروفورز این پروتئین‌ها از جمله روش‌های کاربردی برای پی بردن به روابط بین گیاهان از لحاظ ژنتیکی می‌باشد (Ravi et al., 2003). گرچه عوامل محیطی در مقدار پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر تأثیرگذار است اما تأثیر کمی بر وجود آن ها در بذر دارد. از مزایای دیگر این دسته از نشانگرها، همبارز بودن آن ها می باشد. با توجه به مطالب مذکور، این نشانگرها معیاری مناسب برای ارزیابی و مطالعه تنوع ژنتیکی هستند (فرشادفر، ۱۳۸۰). قرار گرفتن اکثر توده ها در گروه های مجزا علی رغم وجود تعداد کم باندهای چند شکل مؤید این مطلب است که پروتئین های ذخیره‌ای دانه که از انواع نشانگرهای پروتئینی می‌باشند، بسیار پایدار و دارای چندشکلی بالایی هستند (فرشادفر، ۱۳۸۰). ضریب کوفنتیک محاسبه شده برابر با ۸۹ درصد بود که نشان¬دهنده برازش مناسب دندروگرام (که در پنج گروه ژنوتیپ ها را دسته بندی کرده اند) با داده‌های به دست آمده است. تلاقی ژنوتیپ های KS21193 با شکوفا قابل پیش بینی می باشد و ژنوتیپ درسا نیز دارای بیشترین مقدار پروتئین محلول کل می باشد. نتایج این مطالعه نشان دهنده مناسب بودن این روش برای مطالعه تنوع ژنتیکی سایر ژنوتیپ های لوبیا می باشد. برخی از پروتئین‌پ ها به طور انحصاری در نمونه های دانه مورد مطالعه این بررسی بیان شده اند که این موضوع می تواند به عنوان یک ابزار مفید برای معرفی نشانگر اختصاصی رقم های بذور لوبیای مورد مطالعه به کار روند، چراکه موفقیت الکتروفورز پروتئین ها در شناسایی و تشخیص ارقام به این سبب است که پروتئین های تفکیک شده توسط آن اولین محصول فعالیت ژن ها می باشند. بطورکلی پیشنهاد می شود با کمک آزمون مانتل انطباق داده های ملکولی با داده های صفات کمی در برنامه های به نژادی آتی استفاده و آزمون گردد.

سپاسگزاری

از همکاری مطلوب جناب آقای مهندس قدیری، مرکز تحقیقات حبوبات خمین جهت در اختیار قرار دادن ژنوتیپ های این مطالعه، دکتر علی مصطفایی استاد مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه همکاری در استفاده از آزمایشگاه الکتروفورز پروتئین و خانم دکتر رویا کرمیان استاد گروه زیست شناسی دانشگاه بوعلی سینا جهت بازخوانی گزارش حاضر تقدیر بعمل می آید.

منابع

ابوذری گزافرودی، ا.، هنرنژاد، ر.، فتوکیان، م. و اعلمی، ع. (۱۳۸۵) مطالعه همبستگی صفات مهم زراعی و تجزیه علیت در برنج. علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی. ۲: ۱۰۶-۹۹.

اسماعیلی، ا.، مجیری، ف. و حسینی، س. ز. (۱۳۹۲) استفاده از نشانگرهای اینترون-اگزون برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در دو زیرگونه آویشن دنایی (*Thymus daenensis*). تاکسونومی و بیوسیستماتیک. ۵ (۱۶): ٥٤-٤١.

بهی، م.، سفالیان، ا.، شکرپور، م.، اصغری، ع.، خماری، س. و فیروزی، ب. (۱۳۹۲) ارزیابی ارتباط بین مقاومت به یخ زدگی با نشانگرهای پروتئین های ذخیره ای و برخی صفات فیزیولوژیکی در جو زراعی (*Hordeum vulgare* L.). به نژادی گیاهان زراعی و باغی. ۱ (۱): ۱-۱۰.

رجبی هشجین، م.، فتوکیان، م. ح.، آقایی سربرزه، م. و محمدی، م. (۱۳۹۲) بررسی تنوع آللی و ارزیابی کیفیت پروتئین های ذخیره ای بذر در گندم های دوروم. بیوتکنولوژی کشاورزی. دوره ۵، شماره ٤، ۵ (٤): ۱۷-۳٦.

رضوی زاده، ر. و رستمی، ف. (۱۳۹٤) استفاده از الگوهای پروتئینی در بررسی تنوع ژنتیکی برخی ارقام منتخب کلزا. تاکسونومی و بیوسیستماتیک. ۵ (۱٦): ۸٤-۷۵.

ریاست، م. و نصیرزاده، ع. ر. (۱۳۸۳) بررسی تنوع ژنتیکی شنبلیله های چند ساله با استفاده از الکترفورز پروتئین های ذخیره ای بذر. دو فصلنامه تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، سال دوازدهم، شماره ۲.

صالحی، ح.، چهرقانی راد، ا.، عطری، م. و محسن زاده، ف. (۱۳۹۲) مطالعه تنوع زیستی با استفاده از روش DSS و مقایسه پروتئین های ذخیره ای بذر جمعیت دو گونه بومادران در غرب ایران. تاکسونومی و بیوسیستماتیک ۵ (۱٦): ٦۸-۵۵.

فرشادفر، ع. ۱۳۸۰. اصول و روش های آماری چندمتغیره. انتشارات دانشگاه رازی کرمانشاه.

معصومی، س. م.، کهریزی، د.، سورنی، ج.، رستمی، ح.، مصطفایی، ا. و کیانی، س. (۱۳۹۰) تنوع ژنتیکی توده زیره سبز (*Cuminum cyminum*) با توجه به پروتئین های ذخیره ای بذر با SDS-PAGE. دومین کنفرانس سالانه دانشگاه رازی.

نارویی راد، م. ر.، فرزانجو، م.، فنایی، ح. ر.، ارجمندی نژاد، ا.، قاسمی، ا. و پل شکن پهلوان، م. ر. (۱۳۸۵) بررسی تنوع ژنتیکی و تجزیه به عامل ها برای صفات مورفولوژیک توده های بومی گندم سیستان و بلوچستان. پژوهش و سازندگی. ٤ (۱۹): ۵۷-۵۰.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Garcia, E., Jamilena, M., Alvarez, J. I., Arnedo, T., Oliver, J. L. and Lozano, R. (1998) Genetic relationships among melon breeding lines revealed by RAPD markers