

## ارزیابی تعدادی از یونجه‌های چند ساله (*Medicago sativa* L.) بر اساس عناصر شیمیایی و ترکیبات غذایی و بررسی تنوع ژنتیکی آنها با استفاده از نشانگر (SDS-PAGE)

شراره فارغی<sup>۱</sup>، محسن فرشادفر<sup>۲</sup> و عزت‌الله فرشادفر<sup>۳</sup>

۱- مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه.

۲- استادیار دانشگاه پیام نور و مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه، E-mail: Farshadfarmohsen@Yahoo.com

۳- دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی کرمانشاه.

### چکیده

تنوع ژنتیکی یکی از مهمترین شاخصها جهت انتخاب والدین در برنامه‌های اصلاح گیاهان می‌باشد. این تحقیق به منظور مطالعه تعیین کیفیت علوفه و میزان تنوع ژنتیکی موجود بین یونجه‌های چند ساله بر اساس نشانگر (SDS-PAGE) انجام گرفت. ترکیبهای شیمیایی مورد ارزیابی عبارت است از: درصد ماده خشک، درصد پروتئین خام، درصد الیاف خام، درصد خاکستر و درصد عناصر کلسیم، فسفر، سدیم، پتاسیم، منیزیم، مس، منگنز، روی و آهن در برگ و ساقه ۱۸ ژنوتیپ یونجه (*Medicago sativa*) مورد ارزیابی قرار گرفت و بررسی پروتئینهای ذخیره‌ای بذر و برگ به روش SDS-PAGE انجام شد. تجزیه واریانس بر روی ترکیبهای شیمیایی انجام گرفت و مقایسه میانگینها با استفاده از آزمون دانکن (DMRT) صورت گرفت. تجزیه خوشه‌ای بر اساس عناصر و ترکیبهای شیمیایی، ژنوتیپهای یونجه را در پنج دسته و بر اساس پروتئینهای ذخیره‌ای، آنها را به سه دسته تقسیم نمود؛ با توجه به نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای پروتئینهای ذخیره‌ای در هر سه ژل، ژنوتیپهای ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۶، ۱۷ و ۱۸ در یک گروه قرار می‌گیرند. لازم به ذکر است که در سه ژل نامبرده، ژنوتیپ ۱۲ از لحاظ خصوصیات ظاهری (تعداد و شدت باندها) با بقیه ژنوتیپها اختلاف داشته است. نتایج حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بر اساس عناصر و ترکیبهای شیمیایی نشان داد که درصد پروتئین خام و درصد کلسیم به ترتیب متنوع‌ترین هستند.

واژه‌های کلیدی: یونجه، تنوع ژنتیکی، الکتروفورز (SDS-PAGE)، تجزیه خوشه‌ای و ترکیبهای شیمیایی.

### مقدمه

هستند و بیان صفات کمی به شدت تحت تأثیر محیط قرار می‌گیرد. برای رفع این نقایص در دهه ۱۹۶۰ روشهای بیوشیمیایی و آنزیمها که سودمندی آنها در تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی اثبات شده است، مورد بهره‌برداری قرار گرفت. همچنین، مشخص شد که تفاوت بین پروتئینهای ذخیره‌ای بذر و آنزیمها توسط تفاوت آلله‌ها در یک یا چندین لوکوس ژنی کدگذاری می‌شود و نیز

تنوع ژنتیکی کشاورزان و اصلاح‌کنندگان نبات را قادر می‌سازد تا به واسطه انتخاب و اصلاح، گیاهانی جدید و نیز گیاهانی با عملکرد بیشتر که به آفات و بیماریها مقاومند و همچنین به تغییرات محیطی سازگارترند را تولید نمایند (Kameswara Rao, 2004). اطلاعات ژنتیکی حاصل از صفات مورفولوژیکی اغلب اطلاعات محدودی

مراتع کشور انتخاب و در ایستگاه تحقیقاتی مهرگان متعلق به مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی کرمانشاه با اقلیم نیمه خشک سرد تا معتدل (طول جغرافیایی ۵۹ و ۴۶ و عرض جغرافیایی ۰۸ و ۳۴) با خاک لوم (بافت متوسط)، ارتفاع از سطح دریا ۱۲۶۰ متر و میانگین بارندگی سالانه ۴۰۰ میلی‌متر و متوسط دما ۲۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد. طرح مورد استفاده برای این تحقیق، بلوکهای کامل تصادفی با ۱۸ تیمار و ۳ تکرار بود. فاصله ردیفها از یکدیگر ۵۰ سانتیمتر و فاصله بوته‌ها بر روی ردیفها از یکدیگر ۳۰ سانتیمتر و طول هر پلات ۲ متر در نظر گرفته شد. با توجه به این که گیاه یونجه یک نبات علوفه‌ای است اطلاع از ترکیبات شیمیایی آن اهمیت داشته و در تغذیه دام نقش اساسی دارد. به همین منظور آزمایشهای تجزیه ترکیبات شیمیایی زیر در آزمایشگاه تغذیه بخش تحقیقات دامپروری این مرکز انجام گرفت. درصد ماده خشک، درصد پروتئین خام، درصد الیاف خام، درصد خاکستر و درصد عناصر کلیسم، فسفر، سدیم، پتاسیم، منیزیم، مس، منگنز، روی و آهن تعیین گردیدند. بر اساس صفات اندازه‌گیری شده و با استفاده از نرم افزارهای MSTAT-C و SPSS محاسبات آماری انجام گرفت. تجزیه واریانس ترکیبات شیمیایی انجام شد و با استفاده از آزمون دانکن، مقایسه میانگینها صورت گرفت. برای دسته‌بندی ژنوتیپها از روش UPGMA استفاده شد. اندازه‌گیری ترکیبات شیمیایی طبق دستورالعمل استاندارد موجود در آزمایشگاه تغذیه و فیزیولوژی بخش تحقیقات دامپروری مرکز تحقیقات منابع طبیعی و امور دام کرمانشاه و فرمولهای زیر انجام گرفت. پروتئین خام نمونه‌ها توسط دستگاه میکروکلدال (مدل 1030 ANALYZER KJELTEC AUTO) پس از مراحل آماده سازی اندازه‌گیری شد.

استفاده از این روشها اثرات عوامل محیطی را تا حدودی حذف می‌کند (Kameswara Rao, 2004). تنوع ژنتیکی درون جمعیتی گونه‌ی *M. polymorpha* که یونجه‌ای یکساله و کاملاً خودگشن را مورد بررسی قرار می‌دهد (Vitale et al., 1998) انتظار می‌رود به علت خودگشن بودن یونجه، تنوع ژنتیکی کمی در داخل جمعیت دیده شود. با این حال، تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌های مختلف در سطوح مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی در آن به فراوانی مشاهده گردیده است. این تنوع ممکن است به دلیل تلاقیهای درون گونه‌ای و بین گونه‌ای با فراوانی پایین و جهشهای اتفاقی و مکرر ایجاد شده باشد. اصلاح گونه‌های علفی دگرگشن، دایمی و با تولیدمثل جنسی عموماً در ایجاد ارقام مصنوعی و اصلاح جمعیت‌های ناهمگن به نتیجه می‌رسد (Kameswara Rao, 2004).

Ahmed در سال ۱۹۹۴ از تکنیک الکتروفورز ژل پلی‌اکریل‌امید SDS برای بررسی هفت گونه از جنس یونجه استفاده کرد و نتایج حاصل را با استفاده از تجزیه خوشه‌ای تحلیل نمود. او نشان داد که الکتروفورز روشی مؤثر برای ارزیابی روابط فنوتیپی در بین رده‌های انتخاب شده است و این تکنیک به‌طور وسیعی در مطالعات رده‌بندی جنسها و نیز ارزیابی تنوع بین گونه‌ها و درون گونه‌ها بکار برده می‌شود. این تحقیق به منظور مطالعه تعیین کیفیت علوفه و میزان تنوع ژنتیکی موجود بین یونجه‌های چند ساله بر اساس نشانگر (SDS-PAGE) انجام گرفت.

## مواد و روشها

تعداد ۱۸ رقم یونجه چند ساله به‌طور تصادفی از بین توده‌های موجود در بانک ژن مؤسسه تحقیقات جنگلها و

با استفاده از دستگاه نوع عمودی (اختریان، ساخت ایران) انجام شد. SDS-PAGE مبتنی بر روش لاملی با تغییرات اندکی است. این روش که معمول‌ترین روش الکتروفورز در حضور SDS محسوب می‌شود کارایی بسیار بالایی در جداسازی پروتئین‌های با وزن مولکولی بیش از ۱۵ کیلو دالتون دارد. سیستم بافری لاملی متداول‌ترین سیستم بافری ناپیوسته در الکتروفورز است. همانطور که یاد شد، در این مطالعه از دستگاه عمودی برای جداسازی پروتئینها استفاده گردید. در الکتروفورز صفحه عمودی ژل بین دو صفحه شیشه‌ای قرار دارد و با مخازن بافر از بالا و پایین در ارتباط مستقیم است، این نوع ارتباط باعث می‌شود تا از میدان الکتریکی اعمال شده حداکثر استفاده بعمل آید (مصطفایی، ۱۳۸۲).

### نتایج

#### تجزیه واریانس بر اساس شاخصهای شیمیایی

نتایج حاصل از آزمایشهای تعیین درصد مواد غذایی برای ۱۸ ژنوتیپ در جدول ۱ آمده است.

مقدار ماده خشک، فیبر و خاکستر برگ و ساقه طبق فرمولهای زیر محاسبه گردیدند.

$$\text{درصد ماده خشک} = \frac{M_3 - M_1}{M_2 - M_1} \times 100$$

وزن خالی ظرف =  $M_1$ ، وزن ظرف + وزن نمونه مرطوب =  $M_2$  و وزن ظرف + وزن نمونه خشک شده =  $M_3$

$$\text{درصد فیبر} = \frac{W_1 - W_2}{P} \times 100$$

وزن مواد خشک شده =  $W_1$ ، وزن خشک خاکستر حاصل =  $W_2$  و وزن نمونه آزمایش شده =  $P$

$$\text{درصد خاکستر} = \frac{M_2 - M_1}{M_0} \times 100$$

وزن نمونه =  $M_0$ ، وزن بوته چینی =  $M_1$  و وزن بوته چینی با خاکستر =  $M_2$

برای تعیین درصد عناصر معدنی از دستگاه اسپکتروسکوپی (Spectroscopy Atomic Absorption) جذب اتمی استفاده شد. در این تحقیق الکتروفورز پروتئینهای بذر و برگ به روش SDS-PAGE (الکتروفورز ژل پلی‌آکریل‌آمید سدیم دودسیل سولفات) و

جدول ۱- میانگین درصد ترکیبات شیمیایی در یونجه‌های دائمی

ژنوتیپ	ماده خشک	پروتئین	نیتر	کلسیم	فسفر	سولفور	سیلیس	پنتین	روی	کربن	نیتروژن	کلسیم	ژنوتیپ
۹/۹۴	۳۳۵/۶۵	۳۵/۱۰	۳۲/۹۳	۱۲/۱۰	۰/۳۳	۰/۱۴	۱/۴۰	۰/۲۳۰	۲/۲۳	۲۸/۶۰	۲۰/۳۲	۹۴/۸۲	۱
۹/۸۰	۲۲۸/۰۰	۲۵/۷۸	۳۰/۰۳	۱۱/۴۳	۰/۲۹	۰/۱۶	۱/۳۶	۰/۲۲۰	۲/۵۵	۲۹/۲۹	۲۰/۱۷	۹۴/۶۲	۲
۹/۸۳	۳۱۳/۸۰	۲۸/۷۳	۳۳/۲۸	۱۳/۳۳	۰/۳۶	۰/۱۱	۱/۳۴	۰/۲۳۰	۲/۰۷	۲۸/۶۰	۲۰/۶۷	۹۴/۵۵	۳
۹/۰۴	۲۷۸/۹۰	۲۸/۹۰	۳۲/۳۵	۹/۷۰	۰/۳۶	۰/۱۳	۱/۳۹	۰/۲۱۵	۲/۱۳	۲۷/۹۲	۲۱/۸۴	۹۴/۳۳	۴
۹/۲۲	۲۶۰/۶۰	۲۴/۶۰	۳۱/۰۵	۱۰/۳۳	۰/۳۸	۰/۱۰	۱/۳۰	۰/۲۲۵	۲/۲۷	۲۷/۸۷	۲۰/۷۸	۹۵/۴۵	۵
۹/۰۱	۳۷۶/۹۵	۲۹/۹۳	۳۲/۱۸	۱۱/۲۵	۰/۳۴	۰/۱۱	۱/۳۰	۰/۲۲۰	۲/۳۰	۲۷/۵۲	۲۰/۶۳	۹۴/۲۸	۶
۹/۳۰	۲۳۶/۸۵	۲۸/۶۵	۳۱/۰۰	۸/۹۵	۰/۳۳	۰/۱۴	۱/۱۹	۰/۲۱۰	۲/۱۲	۲۹/۶۵	۱۹/۴۰	۹۵/۱۹	۷
۹/۵۴	۲۸۸/۱۰	۲۶/۵۸	۳۳/۱۰	۱۱/۷۵	۰/۳۵	۰/۱۵	۱/۲۶	۰/۲۱۵	۲/۱۰	۲۷/۳۵	۲۰/۵۲	۹۴/۷۱	۸
۹/۳۲	۲۳۵/۱۵	۳۵/۵۵	۳۲/۰۰	۱۴/۹۸	۰/۳۸	۰/۱۴	۱/۴۳	۰/۲۷۰	۲/۳۲	۲۹/۱۹	۲۰/۴۲	۹۴/۹۵	۹
۹/۰۲	۲۹۶/۰۵	۳۰/۸۳	۳۴/۵۳	۹/۵۸	۰/۳۶	۰/۲۳	۱/۵۴	۰/۲۷۰	۲/۱۹	۲۴/۵۸	۲۱/۵۵	۹۴/۹۰	۱۰
۹/۰۶	۲۸۲/۵۰	۲۷/۷۵	۳۴/۱۲	۱۱/۱۵	۰/۳۷	۰/۱۶	۱/۳۲	۰/۲۰۵	۲/۲۹	۲۷/۵۷	۲۰/۹۰	۹۴/۸۲	۱۱
۹/۱۹	۲۵۱/۸۸	۲۲/۸۰	۲۹/۴۸	۱۲/۶۰	۰/۳۵	۰/۱۱	۱/۱۲	۰/۲۲۰	۲/۱۰	۳۰/۲۲	۱۹/۱۴	۹۴/۹۷	۱۲
۹/۹۲	۲۶۹/۹۵	۲۶/۱۰	۲۸/۳۰	۱۰/۷۸	۰/۳۲	۰/۱۶	۱/۲۸	۰/۲۰۰	۲/۲۲	۳۰/۷۸	۱۹/۲۲	۹۵/۱۳	۱۳
۹/۹۲	۲۸۲/۲۰	۲۸/۷۸	۳۲/۳۰	۱۰/۳۰	۰/۳۲	۰/۱۰	۱/۱۷	۰/۲۲۵	۲/۳۲	۲۹/۵۰	۲۰/۳۰	۹۵/۱۵	۱۴
۹/۱۰	۲۵۶/۵۰	۲۹/۳۳	۳۰/۱۰	۱۰/۱۰	۰/۳۶	۰/۱۶	۱/۳۵	۰/۲۳۵	۲/۵۱	۲۸/۹۴	۲۰/۵۳	۹۴/۸۲	۱۵
۹/۹۲	۲۷۵/۳۳	۲۹/۳۸	۳۸/۱۵	۱۰/۶۵	۰/۳۵	۰/۱۰	۱/۱۹	۰/۲۲۰	۲/۲۰	۳۰/۶۴	۱۸/۷۷	۹۴/۴۲	۱۶
۹/۰۴	۲۸۵/۴۸	۲۴/۹۵	۳۶/۴۰	۹/۸۵	۰/۳۴	۰/۱۴	۱/۰۹	۰/۱۹۵	۲/۶۷	۲۷/۹۷	۱۹/۳۷	۹۴/۳۷	۱۷
۹/۲۱	۲۵۶/۳۵	۲۶/۱۰	۳۲/۴۵	۹/۸۳	۰/۳۰	۰/۱۲	۱/۳۷	۰/۲۲۰	۲/۳۸	۲۷/۸۴	۲۰/۳۴	۶۳/۹۴	۱۸

نتایج بدست آمده از آزمایشهای تعیین درصد ترکیبات شیمیایی و مواد غذایی که بر روی تک بوته و برای ۱۸ ژنوتیپ مورد مطالعه انجام گرفته در جدول ۱ نشان داده شده است. این نتایج مربوط به چهار صفت تغذیه‌ای و نه عنصر شیمیایی بر مبنای ماده خشک بدست آمده است که: درصد ماده خشک، درصد پروتئین خام، درصد لیاف خام، درصد خاکستر و عناصری مانند کلسیم، فسفر، پتاسیم، سدیم، منگنز، منیزیم، روی، آهن و مس در برگ و ساقه را شامل بود.

ژنوتیپهای مورد مطالعه فقط از لحاظ درصد منیزیم در سطح ۰.۵٪ اختلاف معنی‌داری نشان دادند و سایر صفات هیچ‌گونه اختلافی را نشان ندادند. در جدول ۲ اعداد مربوط به تجزیه واریانس هر صفت نشان داده شده است. برای کلیه صفات، مقایسه میانگین توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح معنی‌دار ۰.۵٪ انجام گرفت. بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه، ژنوتیپهای ۵ و ۹ به ترتیب دارای بالاترین درصد منیزیم می‌باشند.

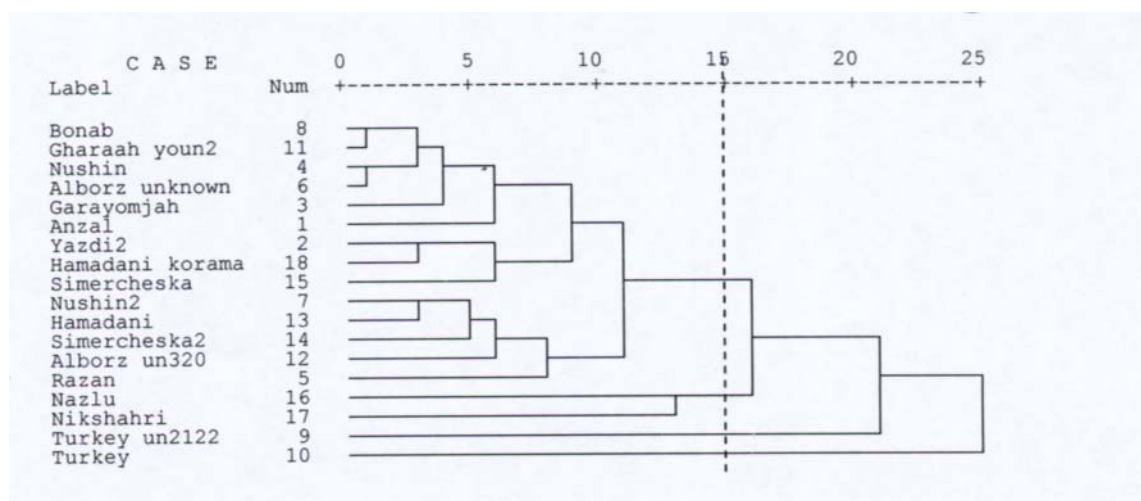
جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس سیزده صفت شیمیایی

منابع تغییرات	Df	DM	CP	CF	Ca	P	K	Na	Mg	Cu	Mn	Zn	Fe	ASH
بلوک	۱	۱/۱ <sup>NS</sup>	۰/۰۷ <sup>NS</sup>	۸/۵۵ <sup>NS</sup>	۰/۰۶ <sup>NS</sup>	۰/۰۰ <sup>NS</sup>	۰/۲۳ <sup>NS</sup>	۰/۰۲ <sup>NS</sup>	۰/۰۰ <sup>NS</sup>	۱/۴۴ <sup>NS</sup>	۳۱/۶ <sup>NS</sup>	۴۴/۷ <sup>NS</sup>	۴۵۴۷۹ <sup>NS</sup>	۸/۴ <sup>NS</sup>
تیمار	۱۷	۰/۲۰ <sup>NS</sup>	۱/۳۴ <sup>NS</sup>	۴/۲۶ <sup>NS</sup>	۰/۰۵ <sup>NS</sup>	۰/۰۰۱ <sup>NS</sup>	۰/۰۳ <sup>NS</sup>	۰/۰۰۲ <sup>NS</sup>	۰/۰۰۱*	۴/۵۳ <sup>NS</sup>	۱۱/۶ <sup>NS</sup>	۲۲/۵ <sup>NS</sup>	۱۴۸۹ <sup>NS</sup>	۰/۳۰ <sup>NS</sup>
اشتباه	۱۷	۰/۳۴۵	۲/۰۶۶	۲/۵۲۵	۰/۰۴۱	۰/۰۰۱	۰/۰۲۰	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰	۴/۱۳۵	۱۲/۴۱	۳۷/۹۷	۱۹۲۲	۰/۲۵۲
CV%	-	۰/۶۲	۷/۰۹	۵/۵۷	۸/۸۵	۱۰/۹۷	۱۱/۰۱	۲۷/۴۳	۶/۵۵	۱۸/۴۴	۱۰/۸۶	۲۱/۸۰	۱۶/۰۷	۵/۰۹

NS غیر معنی دار\* معنی دار در سطح ۰/۰۵

در این بررسی از تجزیه خوشه‌ای برای دسته‌بندی ۱۸ ژنوتیپ مورد نظر برای تجزیه شیمیایی استفاده شد و در نتیجه ۱۸ ژنوتیپ در ۵ گروه قرار گرفتند که عبارتند از: گروه اول شامل ده ژنوتیپ (۸، ۱۱، ۴، ۶، ۳، ۱، ۲، ۱۸، ۱۵، ۷، ۱۳، ۱۴، ۱۲ و ۵)؛ گروه دوم شامل یک ژنوتیپ (۱۶)، گروه سوم شامل یک ژنوتیپ (۱۷)، گروه چهارم شامل یک ژنوتیپ (۹) و گروه پنجم شامل یک ژنوتیپ (۱۰) می‌باشند (شکل ۱).

در این بررسی از تجزیه خوشه‌ای برای دسته‌بندی ۱۸ ژنوتیپ مورد نظر برای تجزیه شیمیایی استفاده شد و در نتیجه ۱۸ ژنوتیپ در ۵ گروه قرار گرفتند که عبارتند از: گروه اول شامل ده ژنوتیپ (۸، ۱۱، ۴، ۶، ۳، ۱، ۲، ۱۸، ۱۵، ۷، ۱۳، ۱۴، ۱۲ و ۵)؛ گروه دوم شامل یک ژنوتیپ (۱۶)، گروه سوم شامل یک ژنوتیپ (۱۷)، گروه چهارم شامل یک ژنوتیپ (۹) و گروه پنجم شامل یک ژنوتیپ (۱۰) می‌باشند (شکل ۱).

شکل ۱- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ۱۸ ژنوتیپ یونجه (*M. sativa*) بر اساس سیزده ترکیب شیمیایی

تجزیه را برای صفات شیمیایی و تغذیه‌ای نشان می‌دهند. در این تحقیق مؤلفه اول ۲۸/۲۹٪، مؤلفه دوم ۲۱/۵۴۸٪، مؤلفه سوم ۱۳/۹۷۷٪ و مؤلفه چهارم ۹/۶۷۳٪ از تغییرات کل داده‌ها را بیان می‌کند.

به منظور تعیین متنوع‌ترین صفات شیمیایی و تغذیه‌ای در میان ۱۳ صفت مورد مطالعه، تجزیه عاملی با استفاده از مؤلفه‌های اصلی واریانس روی داده‌ها انجام شد. جدولهای ۳ و ۴ واریانس مؤلفه‌های اصلی حاصل از

جدول ۳- جدول واریانس مؤلفه‌های اصلی حاصل از تجزیه مؤلفه‌های اصلی برای ترکیبهای شیمیایی ۱۸ ژنوتیپ یونجه

فاکتور	ریشه مشخصه	درصد تجمعی	واریانس تجمعی
۱	۳/۶۷۸	٪۲۸/۲۹۴	٪۲۸/۲۹۴
۲	۲/۸۰۱	٪۲۱/۵۴۸	٪۴۹/۸۴۲
۳	۱/۸۱۷	٪۱۳/۹۷۷	٪۶۳/۸۱۹
۴	۱/۲۵۷	٪۹/۶۷۳	٪۷۳/۴۹۲

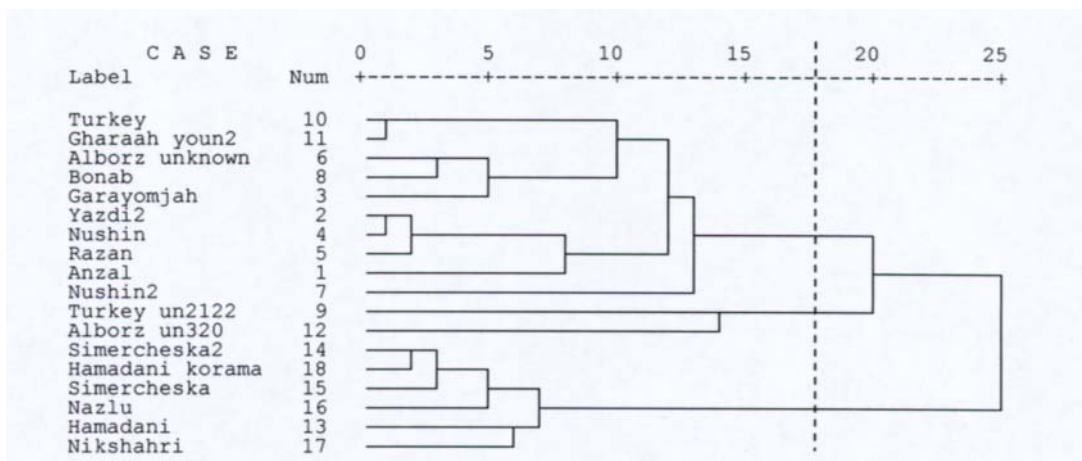
جدول ۴- سهم ترکیبات شیمیایی حاصل از تجزیه مؤلفه‌های اصلی در ۱۸ ژنوتیپ یونجه

فاکتور	ماده خشک	پروتئین	فیبر	کلسیم	فسفر	پتاسیم	سدیم	منیزیم	مس	منگنز	روی	آهن	خاکستر
۱	-۰/۱۱۲	۰/۸۰۵	-۰/۷۵۳	-۰/۱۶۳	۰/۷۵۱	۰/۸۶۳	۰/۵۳۰	۰/۴۶۲	۰/۱۸۷	۰/۲۰۶	۰/۶۵۳	۰/۳۴۱	۰/۰
۲	-۰/۷۰۸	۰/۰	-۰/۳۷۰	۰/۵۱۰	-۰/۳۸۹	-۰/۱۰۹	۰/۱۲۴	-۰/۲۷۹	-۰/۴۸۷	۰/۵۸۳	-۰/۱۲۰	۰/۴۲۹	۰/۹۳۰
۳	-۰/۴۰۱	-۰/۱۷۱	۰/۲۱۵	-۰/۳۸۴	۰/۰	-۰/۲۵۷	-۰/۶۰۶	۰/۳۵۸	۰/۵۱۵	۰/۴۷۳	۰/۳۱۳	۰/۵۲۹	۰/۰
۴	-۰/۱۷۴	-۰/۳۰۱	۰/۳۶۸	۰/۵۳۱	۰/۳۱۰	۰/۱۶۴	۰/۱۰۴	-۰/۳۲۸	۰/۴۲۹	۰/۰	۰/۴۶۲	-۰/۲۲۱	۰/۱۷۹

بررسی نتایج حاصل از الکتروفورز پروتئینهای ذخیره‌ای در این تحقیق، الکتروفورز پروتئینهای ذخیره‌ای (گلوبولینها) بذر و برگ به روش SDS-PAGE انجام شد. در مجموع، در میان ۱۸ ژنوتیپ مورد مطالعه ۶۱ باند مشاهده گردید که در این میان ۳۲ باند مربوط به پروتئینهای پرولامینها (محلول در الکل) بذر و ۱۶ باند متعلق به پروتئینهای گلوبولین (محلول در نمک) بذر و ۱۳ باند باقیمانده مربوط به پروتئینهای گلوبولین برگ می‌باشد. نامگذاری به این ترتیب صورت گرفت که اولین باند در پایین ژل (قطب آندی) و آخرین باند در بالای ژل (قطب کاتدی) قرار داشت. به منظور مشخص کردن میزان تشابه یا فاصله ژنتیکی (Average Linkage) از نظر پروتئینهای ذخیره‌ای بذر و برگ، تجزیه خوشه‌ای انجام گرفت، همچنین برای تأیید تجزیه خوشه‌ای ضرایب جاکارد محاسبه گردید.

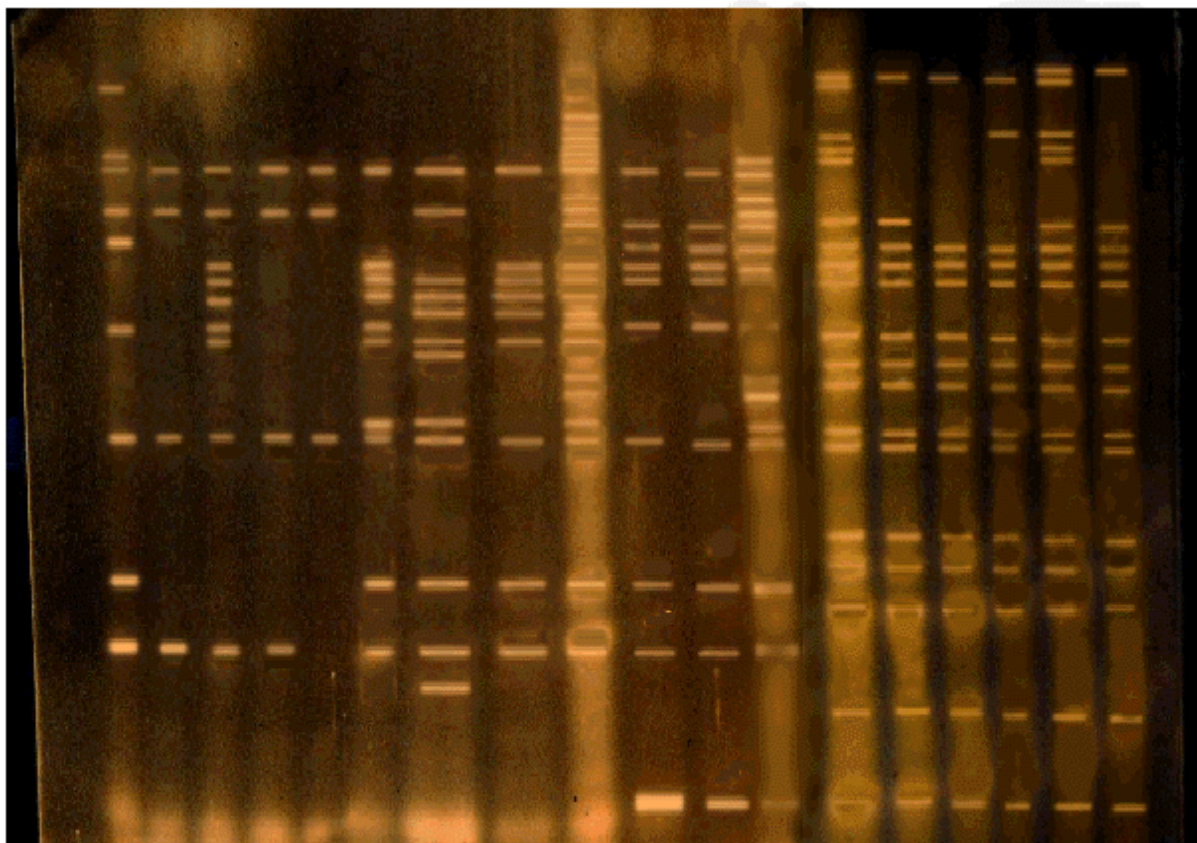
#### نتایج الکتروفورز پروتئینهای بذری محلول در الکل

همانطور که قبلاً ذکر شد تفاوت ظاهری در باندهای ایجاد شده بسیار جزئی می‌باشد. به‌طور مثال ژنوتیپهای ۱۳ تا ۱۸ و همچنین ژنوتیپهای ۲، ۴ و ۵ دارای باندهای بسیار مشابه هستند. از نظر تعداد باندها، بیشترین تعداد مربوط به ژنوتیپ شماره ۹ و ۱۲ که به ترتیب دارای ۲۳ و ۱۸ باند بودند و کمترین تعداد مربوط به ژنوتیپهای ۲، ۴ و ۵ است که تنها دارای ۴ باند می‌باشد. ژنوتیپ ۹ دارای دو باند اختصاصی و ژنوتیپ شماره ۷ و ۱۳ هر یک دارای یک باند اختصاصی هستند (شکل ۳). دندروگرام مربوط به این تجزیه خوشه‌ای در شکل ۲ نشان داده شده است. تعداد گروه‌های انتخابی در این تجزیه ۳ دسته بوده است که ژنوتیپهای ۹ و ۱۲ در یک گروه و بقیه در گروه ۱ و ۲ قرار گرفتند. ضرایب جاکارد (جدول ۵) نتایج تجزیه خوشه‌ای را تأیید می‌کند.



شکل ۲- دندروگرام تجزیه خوشه‌ای ۱۸ ژنوتیپ یونجه بر اساس نتایج الکتروفورز پروتئینهای بذری محلول در الکل

1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18



شکل ۳- ژل الکتروفورز (SDS-PAGE) پروتئین بذری محلول در الکل

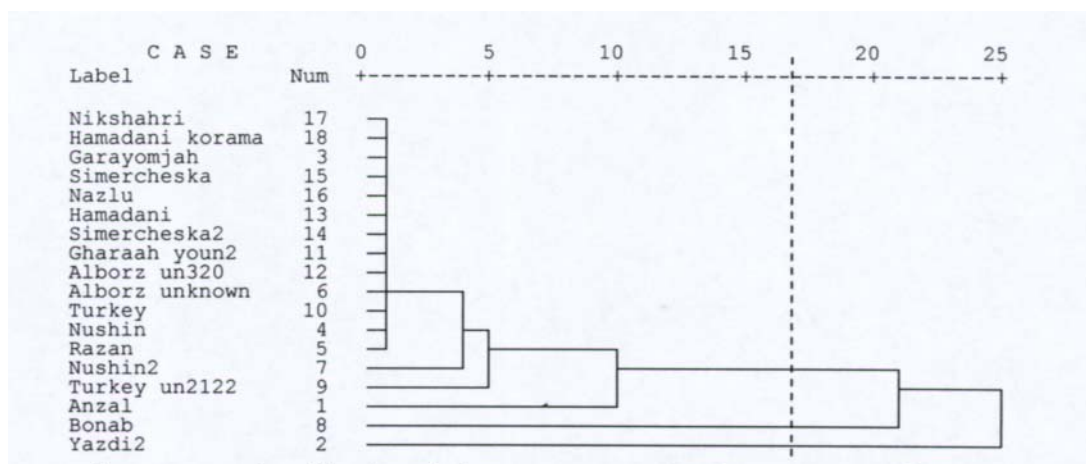




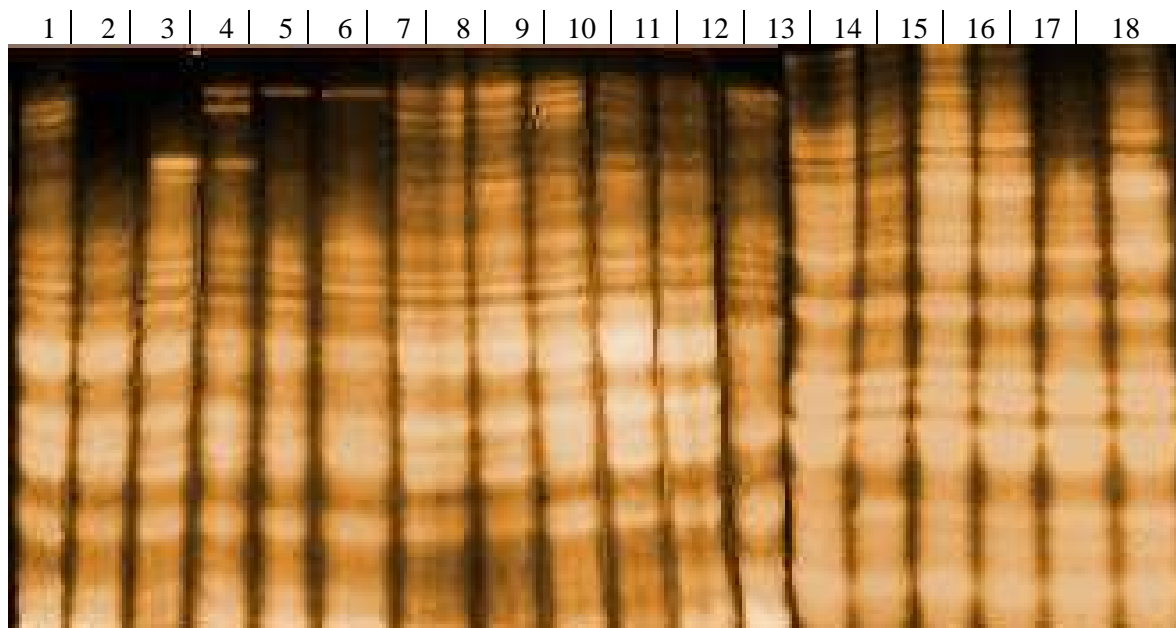
نتایج بدست آمده از تجزیه خوشه‌ای، ۱۸ ژنوتیپ مورد بررسی را به ۳ گروه دسته‌بندی می‌کند به طوری که ژنوتیپهای ۸ و ۲ هر یک به تنهایی در یک دسته جداگانه و بقیه در یک گروه قرار می‌گیرند. در شکل ۴ دندروگرام مربوط به تجزیه خوشه‌ای پروتئینهای محلول در نمک برگ را ارائه می‌دهد. ضرایب جاکارد (جدول ۶) نتایج تجزیه خوشه‌ای را تأیید می‌کند.

### نتایج الکتروفورز پروتئینهای محلول برگ در نمک (گلوتامین)

این نتایج حکایت از این دارد که بیشتر ژنوتیپها از لحاظ تراکم و شدت باندها یکسان بوده و تفاوت چندانی از نظر تعداد باندها با یکدیگر ندارند. در این میان، اختلافاتی نیز در بین ژنوتیپها دیده می‌شود برای مثال، ژنوتیپ شماره ۲ نسبت به سایرین از تعداد بیشتری باند برخوردار است (شکل ۵).



شکل ۴- دندروگرام تجزیه خوشه‌ای ۱۸ ژنوتیپ یونجه بر اساس نتایج الکتروفورز پروتئینهای برگ محلول در نمک



شکل ۵- ژل الکتروفورز (SDS-PAGE) پروتئین برگ محلول در نمک

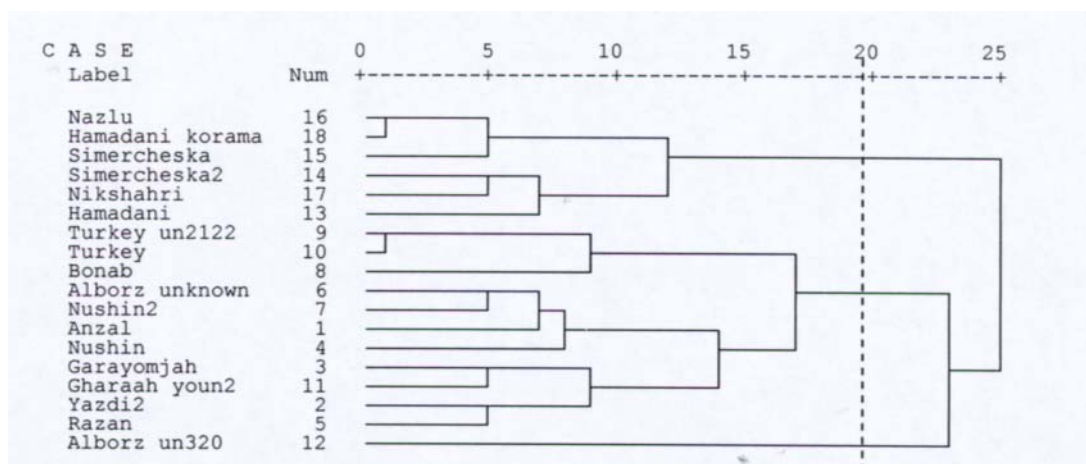
جدول ۶- ضرایب تشابه جاکارد مربوط به پروتئین‌های برگ‌ی محلول در نمک (گلوتامین)

رتبه	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵	۱۶	۱۷	۱۸	
۲	۰/۴۴۴																		
۳	۰/۳۸۵	۰/۴۴۴																	
۴	۰/۴۴۴	۱۰/۰۰۰	۰/۴۴۴																
۵	۰/۳۳۳	۰/۷۵۰	۰/۳۳۳	۰/۷۵۰															
۶	۰/۳۵۷	۰/۲۷۳	۰/۷۲۷	۰/۲۷۳	۰/۱۸۲														
۷	۰/۳۱۳	۰/۳۳۳	۰/۵۰۰	۰/۳۳۳	۰/۲۵۰	۰/۵۷۱													
۸	۰/۳۵۷	۰/۲۷۳	۰/۷۲۷	۰/۲۷۳	۰/۱۸۲	۰/۸۱۸	۰/۵۷۱												
۹	۰/۳۹۱	۰/۱۷۴	۰/۳۹۱	۰/۱۷۴	۰/۱۳۰	۰/۴۳۵	۰/۴۵۸	۰/۴۳۵											
۱۰	۰/۴۶۲	۰/۲۷۳	۰/۴۶۲	۰/۲۷۳	۰/۱۸۲	۰/۵۳۸	۰/۲۹۴	۰/۵۳۸	۰/۳۷۵										
۱۱	۰/۴۶۲	۰/۲۷۳	۰/۴۶۲	۰/۲۷۳	۰/۱۸۲	۰/۵۳۸	۰/۲۹۴	۰/۵۳۸	۰/۳۷۵	۱/۰۰۰									
۱۲	۰/۳۸۹	۰/۲۵۰	۰/۳۱۶	۰/۲۵۰	۰/۱۸۸	۰/۳۶۸	۰/۳۳۳	۰/۳۰۰	۰/۶۲۵	۰/۵۲۹	۰/۵۲۹								
۱۳	۰/۱۲۵	۰/۰۴۸	۰/۱۷۴	۰/۰۴۸	۰/۰۵۰	۰/۲۱۷	۰/۲۰۰	۰/۱۶۷	۰/۳۶۷	۰/۲۷۳	۰/۲۷۳	۰/۳۶۰							
۱۴	۰/۰۹۱	۰/۰۵۶	۰/۲۰۰	۰/۰۵۶	۰/۰۵۹	۰/۲۵۰	۰/۲۲۷	۰/۱۹۰	۰/۳۱۰	۰/۳۱۶	۰/۳۱۶	۰/۳۴۸	۰/۸۳۳						
۱۵	۰/۰۹۵	۰/۰۵۹	۰/۲۱۱	۰/۰۵۹	۰/۰۶۳	۰/۲۶۳	۰/۲۳۸	۰/۲۰۰	۰/۲۷۶	۰/۲۶۳	۰/۲۶۳	۰/۳۰۴	۰/۷۷۸	۰/۹۳۳					
۱۶	۰/۱۳۶	۰/۰۵۳	۰/۱۹۰	۰/۰۵۳	۰/۰۵۶	۰/۲۳۸	۰/۲۱۷	۰/۱۸۲	۰/۳۴۵	۰/۲۳۸	۰/۲۳۸	۰/۳۳۳	۰/۷۰۰	۰/۸۲۴	۰/۸۷۵				
۱۷	۰/۱۶۰	۰/۰۴۳	۰/۱۶۰	۰/۰۴۳	۰/۰۴۵	۰/۲۰۰	۰/۱۸۵	۰/۱۵۴	۰/۴۳۳	۰/۲۵۰	۰/۲۵۰	۰/۳۸۵	۰/۸۱۰	۰/۷۵۰	۰/۷۰۰	۰/۸۰۰			
۱۸	۰/۰۹۵	۰/۰۵۹	۰/۲۱۱	۰/۰۵۹	۰/۰۶۳	۰/۲۶۳	۰/۲۳۸	۰/۲۰۰	۰/۳۲۱	۰/۳۳۳	۰/۳۳۳	۰/۳۶۴	۰/۷۷۸	۰/۹۳۳	۰/۸۶۷	۰/۷۶۵	۰/۷۰۰		

داشتند (از تراکم کمتری برخوردار بودند) (شکل ۷). تجزیه خوشه‌ای صفات الکتروفورزی در شکل ۶ ارائه گردیده است. مطابق این شکل و بر اساس نتایج حاصل از تجزیه تابع تشخیص، ژنوتیپ‌های ۱۶، ۱۸، ۱۵، ۱۴، ۱۷ و ۱۳ در یک دسته، ژنوتیپ‌های ۹، ۱۰، ۸، ۶، ۷، ۱، ۴، ۳، ۱۱، ۲ و ۵ نیز در یک دسته دیگر و ژنوتیپ ۱۲ به تنهایی در یک دسته مجزا قرار می‌گیرند. ضرایب جاکارد (جدول ۷) نتایج تجزیه خوشه‌ای را تأیید می‌کند.

### نتایج الکتروفورز پروتئینهای محلول بذری در نمک (گلوتامین)

در بررسی‌های حاصل از آزمایش الکتروفورز پروتئینهای محلول بذری در نمک، ۱۶ باند تشکیل شد که بیشترین باند مربوط به ژنوتیپ ۱۵ با ۱۵ باند و کمترین باند مربوط به ژنوتیپ ۱۲ که دارای ۹ باند می‌باشد. ژنوتیپ‌های ۱۵، ۱۶ و ۱۸ از نظر شدت و تراکم باند تقریباً یکسان بودند. همچنین ژنوتیپ‌های ۷، ۸ و ۹ در مقایسه با سایر ژنوتیپها از نظر شدت و تراکم برخی از باندها تفاوت



شکل ۶- دندروگرام تجزیه خوشه‌ای ۱۸ ژنوتیپ یونجه بر اساس نتایج الکتروفورز پروتئینهای بذری محلول در نمک



## بحث

منیزیم در تغذیه گیاه نقش بسیار مهمی به عهده دارد. این عنصر برای فتوسنتز و متابولیسم کربوهیدرات ضروری است. از طرف دیگر، منیزیم در متابولیسم ازت و ترکیبات روغن نیز بکار می‌رود. کمبود منیزیم در یونجه و حتی در سایر گیاهان علوفه‌ای، باعث ایجاد بیماری هیپوماگنزمیا (Hyphomagnesia) در نشخوارکنندگان می‌شود (کریمی، ۱۳۶۹). بنابراین با توجه به اهمیت منیزیم در گیاه، باید به ارقامی با درصد منیزیم بیشتر، توجه بیشتری شود. نتایج حاصل از بررسی‌هایی که توسط فضائی (۱۹۹۲) بر روی صفات کمی و کیفی ۶۴ رقم یونجه صورت گرفت نیز مؤید این مطلب بود که بین ارقام معرفی شده و کولتیوارهای ایرانی از نظر درصد مواد معدنی و درصد پروتئین خام اختلاف معنی‌داری وجود نداشته است. Fazli و Yazdisamadi (۱۹۹۲) ۶۴ واریته ایرانی یونجه دائمی را از نظر کیفی و مورفولوژیکی مطالعه کردند.

لازم به ذکر است که بیشترین فاصله مربوط به دسته‌های یک و پنج است. از مقایسه نتایج بررسی گروه‌بندی صفات بر اساس تجزیه شیمیایی می‌توان به این نتیجه دست یافت که ژنوتیپ‌های ۳، ۴، ۱، ۲، ۶، ۱۴، ۱۸ و ۱۱ با ژنوتیپ ۱۰ بیشترین فاصله و در نتیجه کمترین قرابت ژنتیکی را با هم دارند بنابراین در آزمایش‌های تلاقی پروژه‌های اصلاحی می‌توان از آنها بهره گرفت که قاعدتاً این موضوع زمانی می‌تواند به مرحله اجرا در آید که ناسازگاری ژنتیکی بین ژنوتیپها وجود نداشته باشد. مؤلفه اول همبستگی مثبت بالایی با درصد پروتئین خام و همبستگی منفی با درصد فیبر خام دارد. از آنجا که درصد پروتئین خام یکی از صفات

با ارزش در تغذیه دام به شمار می‌آید، می‌توان مؤلفه اول را مؤلفه پروتئین خام نامگذاری نمود. مؤلفه دوم با ۲۱/۵۴۸٪ سهم در تغییرات و همبستگی بالا با درصد خاکستر و همبستگی منفی با میزان ماده خشک دارد. مقادیر خاکستر موجود در گیاه از نظر ارزش غذایی آن اهمیت ندارد، زیرا مقدار خاکستر موجود در گیاه چه از نظر کل مقدار و چه از نظر اجزا ترکیبی آن، بسیار متغیر است (کریمی، ۱۳۶۹). مؤلفه سوم ۱۳/۹۷۷ درصد تغییرات کل داده‌ها را بیان می‌کند و این مؤلفه همبستگی مثبت بالایی با میزان آهن و همبستگی منفی با سدیم دارد. اگرچه، آهن جز ترکیبی مولکول کلروفیل نیست، با این حال، کاتالیزور مورد نیازی است که در ترکیب کلروفیل دخالت دارد. آهن در عمل تنفس نیز دخالت دارد، زیرا جز ترکیبی ماده‌ی رنگی تنفس به نام سیتوکروم است (کریمی، ۱۳۶۹) و از این رو کمبود آن در گیاه سبب اختلال در فرایندهای فتوسنتز و تنفس می‌گردد. با توجه به اهمیت آهن در گیاه و با توجه به همبستگی مؤلفه سوم با این ماده می‌توان مؤلفه سوم را مؤلفه تنظیم‌کننده متابولیسم نامید. مؤلفه چهارم ۹/۶۷۳٪ تغییرات داده‌ها را بیان می‌نماید. این مؤلفه همبستگی مثبت با درصد کلسیم و همبستگی منفی با منیزیم دارد. کلسیم، موجب توسعه سریع رشد ریشه یونجه می‌شود و برای تشکیل غده روی ریشه و در نتیجه تثبیت ازت در خاک ضروری است (کریمی، ۱۳۶۹). با در نظر گرفتن نقش اساسی کلسیم در تثبیت ازت از طریق تشکیل غده، می‌توان مؤلفه چهارم را مؤلفه تثبیت‌کننده ازت نامید. Julier و همکاران (۲۰۰۰) میزان تنوع ژنتیکی بین ارقام مختلف یونجه را بر اساس صفات مورفولوژیکی و کیفیت علوفه محاسبه

### منابع مورد استفاده

- فضائی، ح.، ۱۳۷۱. تعیین ترکیبات شیمیایی و انرژی خام منابع خوراکی دام و طیور استان گیلان، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت مدرس.
- کریمی، ه.، ۱۳۶۹. یونجه. مرکز نشر دانشگاهی، تهران.
- مصطفایی، ع.، ۱۳۸۲. راهنمای نظری و عملی الکتروفورز پروتئین در ژل، چاپ دوم، انتشارات یادآوران، ۱۷۴ صفحه.
- ولیزاده، م.، ۱۳۷۶. استفاده از الکتروفورز پروتئینها در ارزیابی فاصله ژنتیکی گونه‌های یونجه، مجله علوم کشاورزی ایران. جلد ۲۸. شماره ۲.
- Ahmed, M.F., 1994. A study of the cyto- taxonomy for conservation of genetic resources of forage legumes (*Medicago* species) in Omayed Biosphere Reserve. Scientific Report, University of Alexandria, Egypt. Blackstock, W.P., and M.P. Weir, 1999. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular protein. Trends in Biotechnology, 17: 121-127.
- Fazli, H. and Yazdisamadi, B., 1992. Comparison of 64 Iranian and foreign alfalfa land- races and cultivars for their agronomic and qualitative characteristics. Iranian Journal of Agricultural Sciences. 23 (1):15
- Julier, B., Huyghe, C. and Ecalte, C., 2000. Within and Among- Cultivar Genetic Variation in Alfalfa: Forage Quality, Morphology, and Yield. Crop Sci., 40:365-369.
- Kameswara Rao, N., 2004. Plant genetic resources: Advancing conservation and use through biotechnology. African Journal of Biotechnology, 3(2): 136-145.
- Krishnan, H.B. and Sleper, D.A., 1997. Identification of tall fescue cultivars by sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis of seed proteins. Crop Sci., 37:215-219.
- Robins, G.J., Luth, D., Campbell, T.A., Bauchan, G.R., Chunlin He, Viands, D.R., Hansen, J. L. and Brummer, E.C., 2007. Genetic mapping of Biomass production in tetraploid Alfalfa. Crop Science, 47: 1-10.
- Vitale, M., Pupilli, F., Labombarda, P. and Arcioni, S., 1998. RAPD analysis reveals a low rate of outcrossing in burr medic (*Medicago polymorpha* L.). Genetic Resources and Crop Evolution, 45: 337-342.

کرده و در برنامه‌های اصلاحی از نتایج حاصل استفاده کردند.

Krishnan و Sleper (۱۹۹۷) طی بررسیهای الکتروفورزی که روی گیاهی به نام Tall fescue انجام دادند، این گونه نتیجه گرفتند که ارقام از نظر تجزیه گلوبولینها تفاوت چندانی با هم نداشتند. بنابراین از آنها (پروتئینهای محلول در نمک) نمی‌توان برای شناسایی ارقام استفاده کرد. ولی نتایج حاصل از تجزیه پرولامینها به طور مؤثری با هم اختلاف داشتند، نقشه‌های باندهای این پروتئینهای براساس حضور و عدم حضور باندهای پپتیدی ویژه در ارقام مختلف با استفاده از یک دستگاه رایانه‌ای چگالی سنج رسم شد. بنابراین تجزیه SDS-PAGE پرولامینهای قابل حل در الکل می‌تواند به‌عنوان یک روش معتبر برای شناسایی ارقام این گراس مورد استفاده قرار گیرد. ولی‌زاده (۱۳۷۶) پروتئینهای بذری محلول در نمک و بذری محلول در الکل مربوط به برگ و کلروپلاست ۹ گونه یونجه را با استفاده از الکتروفورز جدا و مورد مطالعه قرار داد. نامبرده در مجموع ۶۸ نوار مشاهده و از آنها برای برآورد فاصله ژنتیکی گونه‌های یونجه استفاده نمود و نتیجه گرفت که فاصله ژنتیکی گونه‌های مورد مطالعه کمتر از شباهت ژنتیکی آنهاست. تجزیه خوشه‌ای نیز ۹ گونه را به ۴ گروه تقسیم نمود. Robins و همکاران (۲۰۰۷) نقشه ژنتیکی بیوماس یونجه را در یونجه‌های دایمی بر اساس شاخصهای مولکولی RFLP و SSR مطالعه کردند و QTLهایی که در تولید بیوماس نقش داشتند، شناسایی کردند.

## **Study of chemical composition and nutrition value of prennial lucerne (*Medicago sativa* L.) and genetic diversity based on SDS-PAGE markers**

**S.H. Fareghi<sup>1</sup>, M. Farshadfar<sup>2</sup> and E. Farshadfar<sup>3</sup>**

1- Keramshah Research Centre of Agriculture and Natural Resources. Kermanshah, Iran

2- Payame Noor University (PNU) and Research Centre of Agriculture and Natural Resources, Kermanshah, Iran.

E- mail: Farshadfarmohsen@Yahoo.com

3- Razi Univ. Kermanshah, Iran

### **Abstract**

Genetic diversity is one of the most important criteria to select parents in breeding programs. The research was carried out in order to determine genetic variability among prennial lucerne based on chemical composition, nutrition values and SDS-PAGE traits. 18 lucerne genotypes were cultivated in a randomized complete block design with two replications. Chemical composition, nutrition values and reserved proteins in seeds and leaves were electrophoresed. Based on cluster analysis of SDS-PAGE, 18 genotypes were grouped into 3 clusters. Genotypes 13, 14, 15, 16, 17 and 18 in all SDS-PAGE methods were placed in same group, while genotype 12 was located in separate cluster. Principal components analysis revealed that the crude protein, P and K had the most relative variance amount.

**Key words:** *Medicago sativa* L., genetic diversity, electrophoresis (SDS-PAGE), cluster analysis, chemical composition.