مطالعه تنوع ژنتیکی در سه گونه از گیاه آویشن (*Thymus*) با استفاده از الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر

شهین مهرپور[1]، حسین میرزایی ندوشن[2] و فاطمه سفیدکن[1]

چکیده

جهت مطالعه تنوع ژنتیکی میان جمعیتهایی از آویشن از الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر استفاده گردید. به این جهت بذر ۹ جمعیت از سه گونه *T. pubscens* ,*T. kotschyanus* و *T. persicus* از مناطق شمال و شمال غرب تهیه شد و از الکتروفورز به روش SDS-PAGE جهت مطالعه پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر استفاده شد. باندهای حاصل از کلیه جمعیتها از جهت حضور و عدم حضور و فاصله از مبدأ ارزیابی شد و اطلاعات حاصل مورد تجزیه خوشه‌ای قرار گرفت. جمعیتها به چهار گروه تقسیم‌بندی شدند که در گروه اول جمعیتهای گونه *T. kotschyanus* و در گروه دوم جمعیت جمع‌آوری شده از ارتفاع ۲۲۰۰ متری متعلق به گونه *T. persicus* از زنجان قرار گرفتند. در گروه سوم نیز دو جمعیت دیگر از گونه *T. persicus* جمع‌آوری شده از ارتفاعات ۲۴۰۰ و ۲۶۰۰ متری متعلق به زنجان جای گرفتند اما در گروه چهارم نمونه‌های متعلق به گونه *T. pubscens* قرارگرفتند.

واژه‌های کلیدی: آویشن، الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر، قرابت ژنتیکی و SDS-PAGE

۱- مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، تهران صندوق پستی ۱۱۶-۱۳۱۸۵، E-mail:Mehrpur@rifr-ac.ir

۲- کرج، مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال

مقدمه

آویشن (*Thymus*) گیاهی است چوبی، کوتاه قد، کپه‌ای یا علفی، چند ساله با قاعده چوبی که به خانواده لابیاته (Labiatae) متعلق می‌باشد و به عنوان گیاهی مقوی معده، نیرودهنده، ضد تشنج، ضد نفخ، ضد سرفه، آرام‌بخش، ضد رماتیسم، ضد باکتری و ضد قارچ شناخته شده است. اسانس آن به‌طورعمده در صنایع غذایی، داروسازی، بهداشتی مورد استفاده قرار گرفته و دارای خواص ضد میکروبی قوی می‌باشد (زرگری، ۱۳۶۹). عمده‌ترین ترکیبهای اسانس آن شامل تیمول و کارواکرول می‌باشد، کارواکرول اثر ضدعفونی کننده دارد و در ترکیب برخی مواد آلی مورد استفاده قرار می‌گیرد. فعالیت همکاری تیمول و کارواکرول در مقابل برخی باکتریها گزارش شده است (دیدری و همکاران، ۱۹۹۳).

مطالعات الکتروفورزی جوامع مختلف براساس پروتئین‌های غیرآنزیمی و به‌طورعمده پروتئین‌های ذخیره بذر است. با این‌حال از سایر پروتئین‌های ذخیره مانند پروتئین‌های غده نیز استفاده شده است (عبدمیشانی، ۱۳۷۷).

استفاده از الگوهای پروتئین بذر در مطالعات سیستماتیک بر این پیش فرض مبتنی است که پروتئین‌های افراد مختلف، جمعیت‌های مختلف، گونه‌های مختلف و غیره در صورت داشتن حرکت یکسان در داخل یک ژل مشابهند و پس از رنگ‌آمیزی تولید باندهایی با عرض و شدت به نسبت یکسان می‌نمایند. هریک از باندها به‌عنوان صفتی مجزا مورد بررسی قرار می‌گیرد و فرض براین است که این صفات فرآورده‌های مستقیم ژن می‌باشند. روش عمومی برای ارزیابی تشابهات پروتئین در میان جمعیتها، تاکسونها و غیره بکار گرفتن نوعی معیار شباهت است. شمارش ساده نسبت a/b که در آن a نشانگر تعداد باندهای مشترک و b تعداد کل باندهای یافت شده در دو جمعیت، تاکسون و غیره است روشی مرسوم برای نشان دادن شباهتهای پروتئینی است. اما به هر

حال باید بر این نکته تأکید کرد که این روش به تخمینی از دوری وراثتی منجر نمی‌گردد و بیشتر یک روش اثر انگشت را ارائه می‌دهد (رحیمی نژاد، ۱۳۷۸).

به‌رغم برخی محدودیتهای مربوط به روش کار و تفسیر اطلاعات، پروفیل‌های پروتئین بذر در انواع مختلفی از مطالعات طبقه‌بندی بکار رفته‌اند. ladizinsky و Hymowitz (۱۹۷۹) برخی از امتیازهای این روش را از جمله ثبات پروتئین‌های ذخیره بذر رسیده تحت تأثیر نوسانهای فصلی و محیطی و طول عمر بذر را مورد بحث قرار دادند. همچنین اشاره نمودند که پروفیل‌های پروتئینی اغلب برای هرگونه اختصاصی هستند. از موارد کاربرد این روش:

در مطالعات درون جمعیتی، Nevo و همکاران (۱۹۸۳) برای ۱۵ فنوتیپ از گونه *Hordeum spontaneum* (جو خودرو) ارتباط بین تنوع وراثتی پروتئینی بذر و سازگاری را نشان دادند. Edmonds و Gildewell (۱۹۷۷)، در جمعیتهای یک گونه، در جنس *Solanum* ارتباط بین تنوع وراثتی ریخت‌شناسی و تنوع بین جمعیتی بالایی از نظر پروتئین‌های بذر را ارائه نمودند، همچنین در مطالعات بین گونه‌ای و تاکسونومیک، Comas و همکاران (۱۹۷۹) در هفت گونه از جنس *Rulensia* ارتباط بین پروتئین‌های بذر و اطلاعات مورفولوژیکی جغرافیایی و اکولوژیکی بین هفت گونه از این جنس را تأیید نمودند (رحیمی نژاد، ۱۳۷۸).

در مطالعه‌ای که توسط Lopez- Pujol و همکارانش (۲۰۰۴) در مورد جنس آویشن انجام شد تنوع ایزوزایمی در گونه *T. loscosii* در تشخیص آلو یا آتوتتراپلوئیدی مورد استفاده قرار گرفت. در این گیاه از آنجایی‌که به دلیل کوچک بودن کروموزوم‌ها، تشخیص آلوتتراپلوئید و یا آتوتتراپلوئید بودن در برخی از گونه‌ها و جمعیتهای تتراپلوئید با استفاده از روشهای مرسوم سیتوژنتیکی دشوار است، این محققان از الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر در بررسی دو نکته بهره جستند. نکته اول اینکه آیا گونه و جمعیت مورد مطالعه *T. loscosii* آلوتتراپلوئید یا آتوتتراپلوئید بوده و نکته

دوم اینکه سطح توزیع تنوع ژنتیکی در درون جمعیت چگونه است. به‌علاوه، این محققان از نتایج حاصل از این تحقیق در نیاز به حفاظت از گونه مورد نظر و جلوگیری از فرسایش ژنتیکی آن نیز تأکید نمودند. بر نتیجه این تحقیق مشخص شد که جمعیت مورد نظر آتوتتراپلوئید است و وضوح و ترکیب باندهای حاصل از این روش با تأیید این امر مشخص نمود که تنوع ژنتیکی در برخی از صفات در سطح قابل قبولی وجود دارد و از جمله یکی از جمعیتها دارای تنوع ژنتیکی وسیعی بوده که حفظ خصوصیات ژنتیکی آن جمعیت در شرایط مصنوعی توصیه شده است.

مواد و روشها

بذر ۹ جمعیت از سه گونه *T. pubscens*، *T. kotschyanus* و *T. persicus* از نقاط مختلف شمال و شمال غرب کشورجمع آوری شد. جدول شماره ۱ جمعیتهای مورد استفاده را نشان می‌دهد. جهت مطالعه تنوع ژنتیکی در سطح پروتئین‌های ذخیره بذر در جمعیتهای مورد نظر الکتروفورز به روش SDS-PAGE انجام شد. پس از تهیه محلول‌های مورد نیاز، جهت استخراج پروتئین، ۰/۱ گرم بذر خشک و رسیده از هر نمونه را در هاون چینی به همراه ۳۰ میلی‌لیتر بافر استخراج، سائیده و این عمل در ظرف یخ انجام شد. عصاره حاصل سه بار سانتریفوژ شده و هر بار محلول شفاف رویی جدا و به لوله آزمایش جدیدی منتقل گردید. جهت آماده سازی عصاره پروتئینی، مقدار ۳۰ میکرولیتر از عصاره پروتئینی بدست آمده را با ۳۰ میکرولیتر از بافر نمونه حاوی SDS و بتامرکاپتواتانول مخلوط کرده و به مدت ۳ دقیقه در حمام آب جوش و بعد در دمای اطاق قرار دادیم. پس از آماده سازی ژل، مقدار ۲۰ میکرولیتر از عصاره پروتئینی هر نمونه را درون هر چاهک تزریق نموده و روی آن را بافر الکترود پر نمودیم. شدت جریان مورد استفاده در آزمایش ۶۰ میلی‌آمپر و ولتاژ ۸۰ ولت بود. بعد از رسیدن سطح رنگ برومونفل‌بلو به انتهای ژل زیرین، ژل از دستگاه خارج وتوسط محلول رنگی

کماسی‌بلو به مدت یک شب در دمای اطاق رنگ آمیزی شد. برای وضوح باندهای پروتئینی ژل رنگبری و بعد مورد ارزیابی و مطالعه قرار گرفت (میرزایی ندوشن و همکاران، ۱۳۸۰). پس از تکرار آزمایش اندازه‌گیری باندها انجام شد و از داده‌ها جهت بررسیهای آماری تجزیه کلاستر استفاده گردید. در دندروگرامی که توسط نرم افزار JMP رسم شد، با استفاده از روش Ward، ابتدا داده‌ها استاندارد شده و بعد تجزیه کلاستر انجام شد. فاصله بین زیر کلاسترها بر اساس واریانس بین گروهی با استفاده از ضریب تشابه Jaccard مشخص و جهت رسم منحنی مورد استفاده قرار گرفت.

جدول شماره ۱- فهرست جمعیتهای مورد مطالعه از گونه‌های آویشن، محل جمع‌آوری وکد شناسایی آنها

جمعیتها	گونه‌ها	محل جمع آوری	کد
۱	*Thymus kotschyanus*	آذربایجان شرقی	K1
۲	*T. kotschyanus*	سیراچال	K2
۳	*T. kotschyanus*	میانه	K3
۴	*T. persicus*	زنجان (ارتفاع ۲۲۰۰ متر)	Pe1
۵	*T. persicus*	زنجان (ارتفاع ۲۴۰۰ متر)	Pe2
۶	*T. persicus*	زنجان (ارتفاع ۲۶۰۰ متر)	Pe3
۷	*T. pubescence*	چالوس	Pu1
۸	*T. pubescence*	شمشک	Pu2
۹	*T. pubescence*	نیک نام	Pu3

نتایج

از اندازه‌گیری مقادیر تحرک نسبی باندها مطابق جدول شماره۲، تعداد ۱۲ باند در نقشه پروتئینی حاصل از SDS-PAGE بدست آمد. به طور کلی و به اختصار می‌توان باندهای حاصل را به شرح زیر مورد توجه قرار داد.

باند شماره ۱، درهر سه گونه مشاهده شد و در گونه *T. pubscens* از تراکم بیشتری برخوردار بود. باند شماره ۲، در دو گونه *T. pubscens* و *T. persicus* دیده شد. باندهای شماره ۳ و ۵ در گونه *T. persicus* موجود بودند. باندهای شماره ۲، ۳، ۴ و ۵ در گونه *T. kotschyanus* و همچنین در جمعیت جمع آوری شده از ارتفاع ۲۲۰۰ متری متعلق به گونه *T. persicus* از شهرستان زنجان موجود نبودند. باند شماره ۶، فقط در گونه *T. persicus* مشاهده شد. باندهای شماره ۷ و ۸ در تمامی جمعیتها و گونه‌ها مشاهده و در گونه *T. pubscens* از ضخامت بیشتری برخوردار بودند. باند شماره ۹ مخصوص گونه *T. pubscens* بود. باندهای شماره ۱۰، ۱۱ و ۱۲ در تمامی گونه‌ها مشاهده شد و ضخامت آن در دو گونه *T. pubscens* و در *T. persicus* در دو جمعیت آن بیشتر بود. در جمعیت جمع آوری شده از ارتفاع ۲۲۰۰ متری متعلق به گونه *T. persicus* از شهرستان زنجان ضخامت این باندها مشابه گونه *T. kotschyanus* بود.

جدول شماره ۲- کدبندي اطلاعات موجود در نقشه پروتئيني بذر گونه‌ها و جمعيتهاي آويشن

شماره	BM	Azr	Sir	Mia	P-2200	P-2400	P-2600	Cha	Shem	Nic
۱	۰/۶	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۲	۰/۹	۰	۰	۰	۰	۱	۱	۱	۱	۱
۳	۱/۵	۰	۰	۰	۰	۱	۱	۰	۰	۰
۴	۱/۷	۰	۰	۰	۰	۱	۱	۱	۱	۱
۵	۱/۸	۰	۰	۰	۰	۱	۱	۰	۰	۰
۶	**۲**	**۰**	**۰**	**۰**	**۱**	**۱**	**۱**	**۰**	**۰**	**۰**
۷	**۲/۴**	**۱**	**۱**	**۱**	**۱**	**۱**	**۱**	**۱**	**۱**	**۱**
۸	**۲/۶**	**۱**	**۱**	**۱**	**۱**	**۱**	**۱**	**۱**	**۱**	**۱**
۹	**۳/۱**	**۰**	**۰**	**۰**	**۰**	**۰**	**۰**	**۱**	**۱**	**۱**
۱۰	**۳/۴**	**۱**	**۱**	**۱**	**۱**	**۱**	**۱**	**۱**	**۱**	**۱**
۱۱	**۴**	**۱**	**۱**	**۱**	**۱**	**۱**	**۱**	**۱**	**۱**	**۱**
۱۲	**۴/۷**	**۱**	**۱**	**۱**	**۱**	**۱**	**۱**	**۱**	**۱**	**۱**

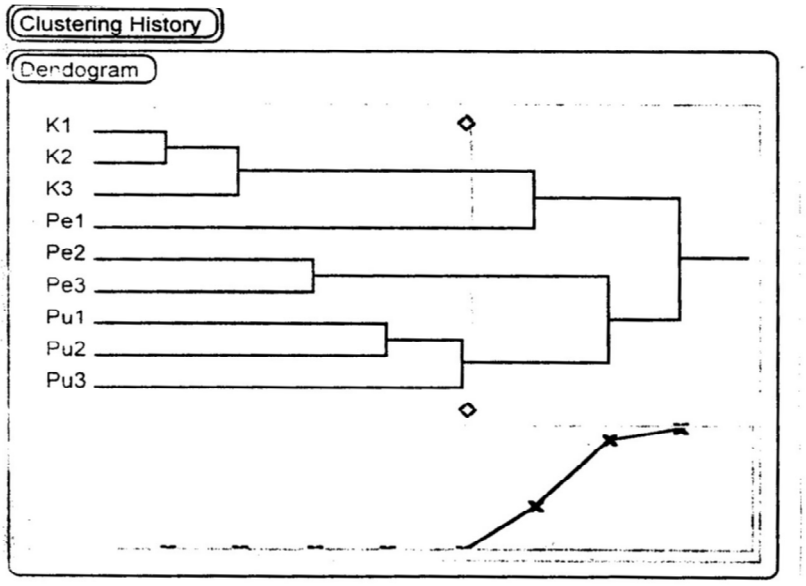
بحث

از آنجایی‌که پروتئین‌ها تولیدات مستقیم ژنهای موجود می‌باشند، هر گونه تنوعی در حضور یا عدم حضور و نیز مقدار آنها، ناشی از تنوع ژنتیکی می‌باشد. از این‌رو چنانکه مشاهده می‌شود تنوع ژنتیکی زیادی بین و درون گونه‌های مورد مطالعه وجود دارد، به نحوی که بعضی از باندهای حاصل، در بعضی از گونه‌ها انحصاری هستند (باندهای شماره ۶ و ۹). همچنین تراکم برخی از باندها در گونه‌های مختلف با یکدیگر تفاوت دارد که بیانگر مقدار متفاوت پروتئین مربوط به آن باند می‌باشد.

به منظور بررسی فاصله ژنتیکی جمعیتها دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای داده‌های موجود در شکل شماره ۱ ارائه شده است. در دندروگرام مشاهده می‌شود که جمعیتهای مربوط به هر گونه در کنار یکدیگر قرار گرفته‌اند. در یک تقسیم‌بندی کلی جمعیتها به دو گروه عمده که شامل گروه ۱ جمعیتهای گونه *T. kotschyanus* همراه جمعیت جمع‌آوری شده از ارتفاع ۲۲۰۰ متری متعلق به گونه *T. persicus* از

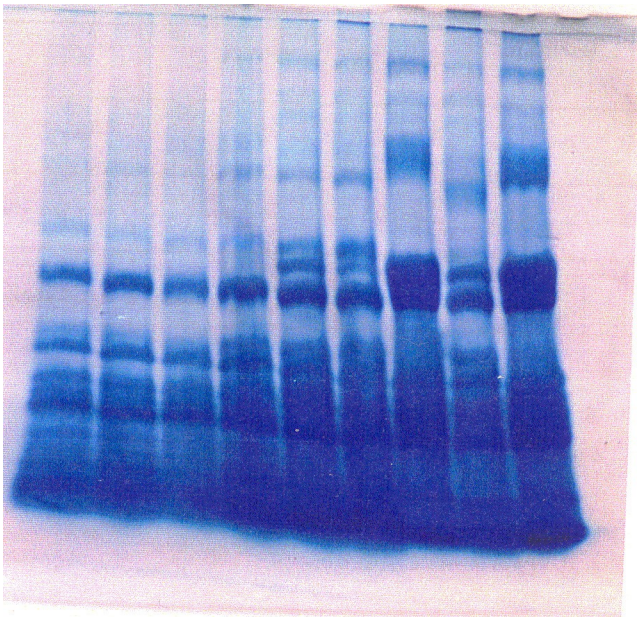
شهرستان زنجان می‌باشد و در گروه دوم سایر جمعیتهای گونه *T. persicus* و گونه *T. pubscens* قرار دارند.

در تقسیم‌بندی جزیی‌تر و در محلی که نقطه عطف منحنی قرار می‌گیرد جمعیتها به چهار گروه تقسیم می‌شوند. در گروه اول جمعیتهای گونه *T. kotschyanus* و در گروه دوم جمعیت جمع‌آوری شده از ارتفاع ۲۲۰۰ متری متعلق به گونه *T. persicus* از شهرستان زنجان و در گروه سوم دو جمعیت دیگر از گونه *T. persicus* که شامل جمعیتهای جمع‌آوری شده از ارتفاعات ۲۴۰۰ و ۲۶۰۰ متری متعلق به شهر زنجان است و در گروه چهارم نمونه‌های متعلق به گونه *T. pubscens* قرارگرفتند. تصویر تهیه شده از ژل پلی‌اکریل امید در شکل شماره ۲ نشان داده شده است.



شکل‌شماره ۱- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای اطلاعات حاصل از الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر در نمونه‌های مورد آزمایش از گیاه آویشن

G1 G2 G3 G4 G5 G6 G 7 G8 G9



شکل شماره ۲: نیمرخ الکتروفورزی ژل پلی‌اکریل‌آمید پروتئین بذر در گیاه آویشن

G۱ گونه *T. kotschyanus* نمونه آذربایجان شرقی G۶ گونه *T. persicus* نمونه زنجان (ارتفاع۲۶۰۰ متر)

G۲ گونه *T. kotschyanus* نمونه سیراچال G۷ گونه *T. pubscens* نمونه چالوس

G۳ گونه *T. kotschyanus* نمونه میانه G۸ گونه *T. pubscens* نمونه شمشک

G۴ گونه *T. persicus* نمونه زنجان(ارتفاع ۲۲۰۰ متر) G۹ گونه *T. pubscens* نمونه نیک‌نام

G۵ گونه *T. persicus* نمونه زنجان(ارتفاع ۲۴۰۰ متر)

سپاسگزاری

از ریاست محترم مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع و مسئولان محترم بخش ژنتیک و فیزیولوژی که امکانات انجام این تحقیق را فراهم نمودند تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

رحیمی نژاد، م.، ۱۳۷۸. سیستماتیک ملکولی گیاهی. انتشارات دانشگاه صنعتی اصفهان, ص ۶۵-۳۳

زرگری، ع.، ۱۳۶۹، گیاهان دارویی، مؤ سسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران، جلد چهارم، ص۴۲-۳۸

عبدمیشانی، س.، نجات بوشهری, ع., ۱۳۷۷. اصلاح نباتات تکمیلی. انتشارات دانشگاه تهران, چاپ اول. جلد دوم ص ۱۶۹-۵۲

میرزایی ندوشن، ح.، شریعت، آ. و اسدی کرم، ف.، ۱۳۸۰. الکتروفورز گونه‌هایی از تاغ، تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران. شماره ۶.

Comas, C.I., Hunziker, J.H. and Crisci, J.V., 1979. Species relationships in Rulensia as shown by seed protein electrophoresis. Biochemical Systematic Ecology, 7:303-308.

Didry, N., Dubreuhl, L. and Pinkas, M., 1993. Antimicrobial activity of thymol, carvacrol and cinnamaldehyde alone or in combination. Pharmazie, 48, 301 304.

Edmonds, J.M. and Gildewell, S.M., 1977. Acrylamid gel electrophoresis of seed proteins from some *Solanum* (section *Solanum*) species. Plant Systematic Evolution, 127:277-291.

Gordon, A.H., 1975. Electrophoresis of proteins in polyacrylamide and starch gels. New york, Elsevire.

Ladizinsky, G. and Hymowitz, T., 1979. Seed protein electrophoresis in taxonomic and evolutionary studies. Theorical Genetic, 54: 145-151.

Lopez-Pujol, J., Bosch, M., Simon, J. and Blanche, C., 2004. Allozyme diversity in the tetraploid endemic Thymus loscosii (Lamiaceae). Annals of Botany, 93: 323-332

Nevo, E., A. Beile, Stoech, H. Doll and B. Andersen, 1983. Microgeographyic edaphic differentiation in hordein polymorphisms of wild barley. Theorical Applied Genetic, 64: 123-132.