دو فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ١٦، شمارهٔ ٢، صفحهٔ ٢٥٣-٢٤٧ (١٣٨٧)

کاربرد نشانگر بیوشیمیایی (پروتئینها) در مطالعه تنوع درون گونه‌ای در هفده جمعیت از آگروپیرون *Agropyron elongatum* L.

عادله رافضی[1] ، محسن فرشادفر [2*] ، عزت اله فرشادفر[3]

١ - کارشناس ارشد، اصلاح نباتات دانشگاه رازی، کرمانشاه.

٢ *- نویسنده مسئول مکاتبات، استادیار دانشگاه پیام نور، کرمانشاه. پست الکترونیک: farshadfarmohsen@yahoo.com

٣ – استاد دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه.

تاریخ دریافت: ١٣٨٧/٣/٢٥ تاریخ پذیرش: ١٣٨٧/٩/١٠

چکیده

آگروپیرون یکی از گیاهان مقاوم به تنش‌های حیاتی و غیر حیاتی می‌باشد، و نقش مهمی در تولید علوفه در مراتع ایران دارد. تنوع ژنتیکی بر اساس نشانگرهای مختلف نقش کلیدی در عملیات اصلاح نبات دارد و یکی از مهمترین شاخص‌ها جهت انتخاب والدین می‌باشد. در این تحقیق، الگوی پروتئینی١٧ جمعیت آگروپیرون (*Agropyron elongatum L.*) برای تعیین تنوع ژنتیکی موجود مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور پس از استخراج پروتئین‌های ذخیره‌ای برگ، غلظت پروتئین‌ها توسط روش برادفورد تعیین گردید. سپس برای تفکیک پروتئین‌های استخراج شده از روش SDS-PAGE تک بعدی استفاده شد. پس از رنگ آمیزی ژل پلی اکریلامید با نیترات نقره، به منظور تجزیه داده‌های الکتروفورزی به حضور هر یک از باندها عدد یک و به عدم حضور آنها عدد صفر داده شد. تعداد یازده باند در جمعیت‌های مطالعه شده مشاهده گردید. بیشترین تعداد باندها مربوط به جمعیت‌های ٥، ٦ و ١٦ و کمترین تعداد مربوط به جمعیت ١٥ بود .تجزیه خوشه‌ای بر اساس ضریب تشابه جاکارد انجام شد و جمعیت‌های مورد بررسی به ٣ کلاستر تقسیم شدند. با توجه به ماتریس تشابه بر مبنای ضرایب جاکارد، در برنامه‌های به نژادی، تلاقی جمعیت ١٥ با جمعیت ٦ و جمعیت ٩ با جمعیت ٦ قابل توصیه است.

واژه‌های کلیدی: آگروپیرون، تنوع درون گونه‌ای، SDS- PAGE ، تجزیه خوشه‌ای،

مقدمه

آگروپیرون یکی از مهمترین گیاهان مرتعی می‌باشد که گونه‌های مختلف آن در اغلب مراتع کشور می‌رویند. آگروپیرون گیاهی علفی چندساله بوده و حدود ١٩ گونه از آن در مناطق مختلف ایران گزارش شده است (Bor, 1970). این گیاه سازگاری وسیعی داشته و در آب و هوای متفاوت رشد و نمو می‌کند. لذا حفظ ذخیرهٔ ژنتیکی و کاربرد علمی و صحیح از این منبع ژنتیکی باعث احیاء مراتع و افزایش تولید علوفه کشور می‌گردد. با توجه به اینکه تنوع زیادی بین و درون گونه‌های مختلف این گیاه وجود دارد، لذا قدرت انتخاب جهت اصلاح صفات مطلوب بالا بوده و اصلاح کنندگان نبات را قادر خواهد ساخت که عملیات اصلاح نبات را با موفقیت و اطمینان بیشتری هدایت کرده و پیش ببرند.

رجبی (۱۳۷۸) میزان تنوع ژنتیکی بین گونه‌های مختلف آگروپیرون را بر اساس صفات کاریوتیپی، شیمیایی و فنو تیپی محاسبه و گزارش کرده است. در رابطه با کارایی نشانگرهای فوق بحث‌های زیادی شده است که هرکدام کارایی خاص خود را دارند (آقا زاده قولکی و همکاران ۱۳۷۹، شاهسون حسنی ۱۳۷۹،گرجی ۱۳۷۷، عبدی قاضی جهانی و همکاران ۱۳۷۹، Burr *et al.*, 1983، Mazik *et al.*, 1997 ، Smith, 1988). الکتروفورز پروتئینهای ذخیره‌ای، روشی مطمئن است که بوسیله آن می‌توان اختلافات ژنتیکی و روابط بین ارقام را بررسی کرد (علمی آخونی ۱۳۷۰).

هوانگ و همکاران (1992) استفاده از مارکرهای مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی را برای بررسی تنوع ژنتیکی بیان کردند. درویشی زیدآبادی و همکاران (۱۳۷۹) از الکتروفورز پروتئینهای ذخیره ای بذر جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی گیاهان علوفه ای استفاده کرده‌اند. پوپوویک و همکاران (1999) جهت بررسی رابطه ارقام و پلی مورفیسم از مارکرهای شیمیایی- تغذیه‌ای استفاده کردند. میرزایی و همکاران (۱۳۸۰) از پروفایل پروتئینهای ذخیره‌ای بذر جهت مطالعه تنوع ژنتیکی در تاغ استفاده کرده و تفاوتهای زیادی در تعداد و تراکم باندهای حاصل پیدا کردند. شیدایی و همکاران (2000) نشانگرهای بیوشیمیایی پروتئینهای بذر را به منظور مطالعات تنوع درون گونه‌ای پیشنهاد دادند. تاکنون در زمینه ارزیابی تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای آگروپیرون (*A. elongatumL.*) به کمک مارکرهای بیوشیمیایی پروتئینهای ذخیره‌ای برگ مطالعات قابل توجهی صورت نگرفته است، هدف از این تحقیق شناسایی تنوع ژنتیکی و پلی‌مورفیسم درون گونه‌ای آگروپیرون بر اساس پروتئین‌های ذخیره‌ای برگ و در نهایت معرفی جمعیت‌هایی است که از تلاقی آنها می‌توان به بالاترین میزان هتروزیس رسید.

مواد و روشها

در این آزمایش، ۱۷ جمعیت بطور تصادفی از مناطق مختلف استان کرمانشاه جمع آوری شدند (جدول ۱). به منظور استخراج پروتئین، ٦ گرم برگ از هر جمعیت درهاون و به کمک ازت مایع پودر شدند. روی نمونه‌های پودر شده، ۵۰ml بافر استخراج LSB (٦/۰۵۷ گرم تریس، ۲۹/۲۲ گرم کلرید سدیم، ۱ml مرکاپتواتانول (2-ME) ۰/۱درصد و آب مقطر) اضافه گردید. پس از به هم زدن (۲٤ ساعت) و سانتریفوژ (۱۲۰۰۰ دور، ۲۰ دقیقه)، محلول رویی جمع آوری شد و رسوب با ۵۰ml بافر استخراج HSB (٦/۰۵۷ گرم تریس، ۵۸/٤٤ گرم کلرید سدیم، ۱ml مرکاپتواتانول (2-ME) ۰/۱درصد و آب مقطر) مخلوط شد. بعد از به هم زدن (۲٤ ساعت) و سانتریفوژ (۱۲۰۰۰ دور، ۲۰ دقیقه)، محلول رویی فوق و محلول رویی جمع آوری شده قبلی با استون مخلوط شدند. بعد از سانتریفوژ (۱۲۰۰۰ دور، ۲۰ دقیقه)، مایع رویی دور ریخته شده و رسوب در هوای آزاد خشک شد سپس رسوب در آب مقطر حل شد. برای جداسازی پروتئینهای استخراج شده از روش SDS- PAGE تک بعدی استفاده شد. پس از انجام الکتروفورز، به منظور دیدن باندهای پروتئینی، از روش رنگ آمیزی نیترات نقره استفاده شد. به منظور استفاده از اطلاعات الکتروفورزی در آنالیزهای آماری، هر جمعیت براساس داشتن (کد یک) یا نداشتن (کد صفر) یک باند پروتئین کد بندی شدند. با استفاده از نرم افزار آماری SPSS، تجزیه خوشه‌ای براساس ضرایب تشابه جاکارد برای گروه‌بندی جمعیتهای مورد نظر انجام گرفت.

جدول شماره ۱- مشخصات محل جمع آوری جمعیت‌های مورد مطالعه

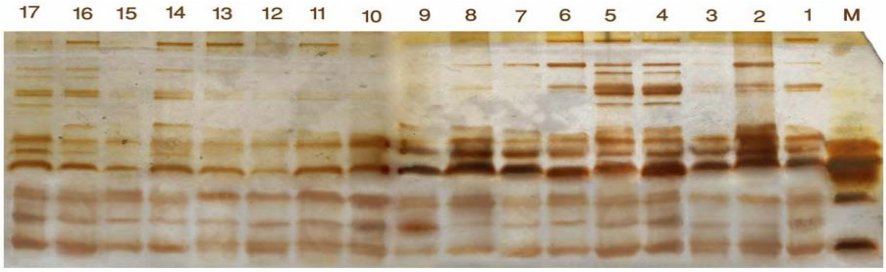
شماره جمعیت	منطقه جمع آوری		علامت اختصاری
	شهرستان	بخش	
۱	اسلام آباد	مرکزی	G1
۲	اسلام آباد	شیان	G2
۳	اسلام آباد	حسن آباد	G3
٤	اسلام آباد	حومه جنوبی	G4
٥	اسلام آباد	حمیل	G5
٦	اسلام آباد	میله سر	G6
۷	جوانرود	مرکزی	G7
۸	روانسر	مرکزی	G8
۹	روانسر	شاهو	G9
۱۰	سنقر	مرکزی	G10
۱۱	صحنه	مرکزی	G11
۱۲	کرمانشاه	مرکزی	G12
۱۳	کرمانشاه	فیروزآباد	G13
۱٤	کرمانشاه	ماهیدشت	G14
۱٥	کرمانشاه	کوزران	G15
۱٦	هرسین	حومه	G16
۱۷	هرسین	بیستون	G17

جدول ۲: حضور(۱) یاعدم حضور (۰) باندهای حاصل از SDS- PAGE در جمعیت‌های مورد مطالعه آگروپیرون

ژنوتیپ باند	۱	۲	۳	٤	٥	٦	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱٤	۱٥	۱٦	۱۷
۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۰	۰	۰	۱	۱	۱	۱	۰	۱	۱
۲	۲	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۱	۱
۳	۰	۰	۰	۱	۱	۰	۰	۰	۰	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۱	۱
٤	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۱	۰	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۱	۱
٥	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۰	۰	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
٦	۰	۰	۰	۱	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۱
۷	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۰	۱	۰
۸	۰	۱	۰	۱	۱	۰	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۰	۰	۰
۹	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۰	۰	۰	۱	۰	۱	۱
۱۰	۱	۱	۱	۰	۱	۰	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۱۱	۰	۰	۰	۱	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰

نتایج

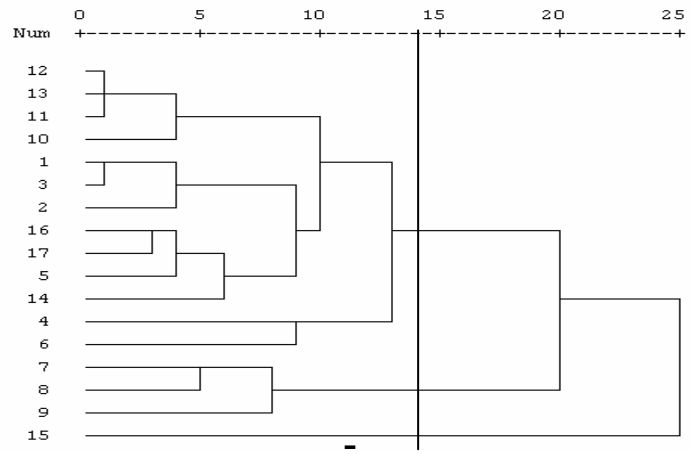
با توجه به اطلاعات جدول ۲ ، در مجموع برای ۱۷ جمعیت مورد مطالعه ۱۱ باند مشاهده گردید، که بیشترین تعداد باندها مربوط به جمعیت‌های ۵ و ٦ و ۱٦ است و کمترین تعداد مربوط به جمعیت ۱۵ است. اگر چه باندهای پروتئینی مشترک زیادی در داخل گونه مذکور وجود داشت، اما باندهای اختصاصی نیز مشاهده شد که خاص هر جمعیت بودند. باندهای پروتئینی نه تنها از نظر محل قرار گرفتن روی ژل و وزن مولکولی، بلکه از لحاظ تراکم و شدت نیز با یکدیگر اختلاف نشان دادند (شکل ۱).



شکل ۱: پروفایل پروتئین‌های ذخیره‌ای برگ ۱۷ جمعیت مورد مطالعه آگروپیرون جهت تعیین میزان شباهت و فاصله ژنتیکی جمعیتهای مورد مطالعه بر اساس ضریب تشابه جاکارد،

تجزیه خوشه‌ای به روش UPMGA انجام گرفت (شکل ۲) که جمعیت‌های مورد مطالعه به ۳ دسته تقسیم شدند به طوری‌که: گروه اول شامل سیزده جمعیت (٦، ٤، ۲ ، ۳ ، ۱ ، ۱٤ ، ۵ ، ۱۷ ، ۱٦ ، ۱۰ ، ۱۱ ، ۱۳ و ۱۲) وگروه دوم شامل سه جمعیت (۷ ، ۸ و ۹) وگروه سوم شامل جمعیت ۱۵ بودند.

ماتریس تشابه بر مبنای ضرایب جاکارد، بر طبق جدول شماره ۳ نشان داد که بیشترین شباهت و کمترین فاصله ژنتیکی مربوط به جمعیتهای (G1, G3)، (G12, G11)، (G13, G11) و (G13, G12) با ضریب تشابه ۱ و کمترین تشابه و بیشترین فاصله ژنتیکی بین جمعیت G6 با جمعیت G9 با ضریب تشابه ۰/۲۲ و جمعیت G6 با جمعیت G15 با ضریب تشابه ۰/۲۵ بود. بنابراین در درون گونه آگروپیرون (*A. elongatum L.*) تنوع وجود داشته که با توجه به فواصل ژنتیکی جمعیت‌ها نسبت به هم، در برنامه‌های به نژادی برای بدست آوردن بالاترین مقدار هتروزیس، تلاقی جمعیت G6 با جمعیت G9 و جمعیت G6 با G15 قابل توصیه است.



شکل ۲: دندروگرام مربوط به الکتروفورز پروتئینهای ذخیره ای جمعیت‌های مطالعه شده آگروپیرون

برای موفقیت برنامه‌های اصلاحی دانستن میزان قرابت ژنتیکی والدین اهمیت بسیار زیادی دارد. طبق بررسی‌های انجام شده، تنوع ژنتیکی خوبی بین جمعیت‌های آگروپیرون مورد مطالعه وجود داشت و این مطلب را که، در اکثر مطالعات مربوط به ارزشیابی تنوع درون گونه‌ای، تنوعی اندک بین جمعیت‌ها یافته‌اند و یا گاهی هیچگونه تنوعی وجود نداشته است، نمی‌توان به عنوان یک پیش فرض برای هر گونه در نظر گرفت. رجبی معماری (۱۳۷۸) تنوع ژنتیکی گونه‌های مختلف آگروپیرون را بر اساس شاخص‌های ریخت شناسی، سیتوژنتیکی و شیمیایی مورد بررسی قرار داده و به نتایج مشابهی دست یافت.

جدول ۳: در صد تشابه بین جمعیتها با استفاده از ضریب تشابه جاکارد

ژنوتیپ	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵	۱۶
۲	۰/۹۲															
۳	۱/۰۰	۰/۹۲														
۴	۰/۶۷	۰/۷۵	۰/۶۷													
۵	۰/۸۰	۰/۸۸	۰/۸۰	۰/۸۹												
۶	۰/۸۳	۰/۷۷	۰/۸۳	۰/۸۰	۰/۶۷											
۷	۰/۶۰	۰/۷۳	۰/۶۰	۰/۴۶	۰/۶۲	۰/۴۰										
۸	۰/۷۳	۰/۸۳	۰/۷۳	۰/۵۷	۰/۷۱	۰/۵۵	۰/۸۹									
۹	۰/۴۴	۰/۶۰	۰/۴۴	۰/۳۳	۰/۵۰	۰/۲۲	۰/۸۶	۰/۷۵								
۱۰	۰/۶۷	۰/۷۷	۰/۶۷	۰/۶۷	۰/۸۰	۰/۵۰	۰/۶۰	۰/۷۳	۰/۴۴							
۱۱	۰/۷۷	۰/۸۶	۰/۷۷	۰/۷۵	۰/۸۸	۰/۶۲	۰/۵۵	۰/۶۷	۰/۴۰	۰/۹۲						
۱۲	۰/۷۷	۰/۸۶	۰/۷۷	۰/۷۵	۰/۸۸	۰/۶۲	۰/۵۵	۰/۶۷	۰/۴۰	۰/۹۲	۱/۰۰					
۱۳	۰/۷۷	۰/۸۶	۰/۷۷	۰/۷۵	۰/۸۸	۰/۶۲	۰/۵۵	۰/۶۷	۰/۴۰	۰/۹۲	۱/۰۰	۱/۰۰				
۱۴	۰/۸۶	۰/۸۰	۰/۸۶	۰/۷۱	۰/۸۲	۰/۷۱	۰/۵۰	۰/۶۲	۰/۳۶	۰/۷۱	۰/۸۰	۰/۸۰	۰/۸۰			
۱۵	۰/۵۰	۰/۴۴	۰/۵۰	۰/۱۸	۰/۳۶	۰/۲۵	۰/۳۳	۰/۲۹	۰/۴۰	۰/۵۰	۰/۴۴	۰/۴۴	۰/۴۴	۰/۴۰		
۱۶	۰/۸۰	۰/۷۵	۰/۸۰	۰/۷۸	۰/۸۹	۰/۶۷	۰/۴۶	۰/۵۷	۰/۳۳	۰/۶۷	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۹۴	۰/۳۶	
۱۷	۰/۸۶	۰/۸۰	۰/۸۶	۰/۸۲	۰/۹۴	۰/۷۱	۰/۵۰	۰/۶۲	۰/۳۶	۰/۷۱	۰/۸۰	۰/۸۰	۰/۸۰	۰/۸۸	۰/۴۰	۰/۹۴

منابع مورد استفاده

-آقازاده قولکی، ر.، ب. قره یاضی، ن. بابائیان جلودار و ق. نعمت‌زاده. ۱۳۷۹، طبقه‌بندی ژرم پلاسم برنج ایرانی با استفاده از نشانگر رپید (RAPD). ششمین کنگره زراعت و اصلاح نباتات ایران. بابلسر، دانشگاه مازندران.

-درویشی زیدآبادی، د.، ح. میرزایی ندوشن، م. حسام زاده و ح. مداح عارفی، ۱۳۷۹. الکتروفورز پروتئینهای ذخیره أی بذر جهت مطالعه تنوع موجود بین ارقام مختلف یونجه *Medicago (sativa)*. در : تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، ۵ : ۱۱۱ – ۱۲٤

-رجبی معماری، ح. ۱۳۷۸. بررسی تنوع ژنتیکی جمعیتهای آگروپیرون با استفاده از روشهای ژنتیکی، سیتوژنتیکی و تجزیه ترکیبات شیمیایی. پایان نامه کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه رازی کرمانشاه

-شاهسون حسنی، ح. ۱۳۷۹. معرفی روش جدید و غیر رادیواکتیو سیتوژنتیک مولکولی هیبریداسیون فلورسنت در محل و کاربرد آن در اصلاح نباتات. ششمین کنگره زراعت و اصلاح نباتات ایران. بابلسر، دانشگاه مازندران.

-عبدی قاضی جهانی، ا.، ا. رزبان حقیقی، ع. ظریفی، ا. طالب پور و ا. برزگر قاضی. ۱۳۷۹. بررسی تنوع ژنتیکی در گونه *Agropyron tauri* . ششمین کنگره زراعت و اصلاح نباتات ایران. بابلسر،دانشگاه مازندران.

-علمی آخونی، ا. ۱۳۷۰. مقدمه‌ای بر بیوشیمی کاربردی. انتشارات دانشگاه تهران.

-فرشادفر، م.و ع. فرشادفر ۱۳۸۱. مطالعه سیتوژنتیکی برخی از گونه‌های آگروپیرون در ایران. پژوهش و سازندگی، ۵۵: ۱۸-۱٤.

-گرجی، ا. ۱۳۷۷. بررسی تنوع ژنتیکی گونه‌های آگروپیرون از نظر سیتوژنتیکی و پروتئینهای ذخیره‌ای دانه. پایان نامه کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران.

-میرزایی ندوشن، ح. ، آ. شریعت و ف. اسدی کرم، ۱۳۸۰. ارزیابی تنوع ژنتیکی موجود در جمعیتهای مختلف تاغ (*Haloxylon sp.*) با استفاده از الکتروفورز. تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان جنگلی و مرتعی ایران، ۷ : ۹۹-۱۱۷.

-Bor, N.L. 1970. Gramineous. In: Flora Iranica, No. 70, (ed. Rechinger, K.H.). Akademisohe Deyok-ll Verlagsonstalt: Graz, Austria, Wien.

-Burr, S.V.E . , Bur, F . A . and Beckmon, J. S. 1983. The application of RFLP to plant breeding. In : Setlow , J.K. and Holaender, A, (Eds). Genetic Engineering Principles Methods. vol 5 Plenum Press London . PP. 45 – 59.

-Hwang, S. F., Berg, B. P., Haward, R. J. and Androw, D. W. 1992. Screening of sainfoin cultivars and lines for yield winter hardiness and resistance to Fusarium crown and root in East Central Alberta. Canadian Plant Disease Survey. 72: 107-111.

-Mazik-Tokei, K., Lelley, T., Gyulai, G., Kiss, E., Heszky, L. 1997. Meiotic and RAPD analysis of dwarf type of *Agropyron repens* L. Cereal Research Communication, 25: 2, 127-133.

-Sheidaie, M., Honarvar, M. and Khatamsaz, M. 2000. numerical taxonomy & seed protein analysis of *Trifolium* species/ population in Iran. Bot, J. Iran. 8: 187-208.

-Smith , J. S. C. and Smith . O. S. 1988. Association among inbred lines of maize using electrophoretic, chromatographic, and pedigree data. 2. Multivariate and cluster analysis of data from Iowa Stiff Stalk Synthetic derived lines. Appl. Genet. 76:39 – 44.

Investigation of intra-specific variation in *Agropyron elongatum* L. using biochemical (proteins) marker

A. Rafezi[1], M. Farshadfar[2*] E. Farshadfar[3]

1- MSc, Razi University, Kermanshah, I.R.Iran.
2*- Corresponding author, Assis. Prof., Payame Noor University, Kermanshah, I.R.Iran.
E-Mail: farshadfarmohsen@yahoo.com
3- Prof. Razi University, Kermanshah, I.R.Iran.

Received: 14.06.2008 Accepted: 30.11.2008

Abstract:

Agropyron is one of the most resistant plant species to biotic and abiotic stresses. It has important role to produce forage yield in rangelands. The most important part of breeding process is to understand the genetic diversity to classify populations for selecting the suitable parents. In this research, protein patterns of 17 populations of *A. elongatum L*. were used to determine genetic diversity. After extraction of leaf proteins, concentration of proteins were identified by Bradford method and banding pattern of the populations were determined by SDS-PAGE technique. Proteins were stained by silver nitrate. In order to analysis electrophoretic data, presence and absence of the protein bands were scored as one and zero respectively. Numbers of bands were counted for each population. Eleven protein bands were observed in studied populations. Populations G5, G6 and G16 showed the most protein bands while G15 showed the least protein bands. Cluster analysis was computed based on coefficient of Jaccard and the populations were divided into three groups. Regarding the genetic distance of the studied populations, crossing of G15 with G6 and G9 with G6, populations are recommendable in breeding programs.

Keywords: *Agropyron elongatum*, Intra-specific variation, SDS-PAGE, Cluster analysis,