

مطالعه ارتباط بین الگوی پروتئین دانه با صفات کمی در برخی ارقام زراعی نخود (*Cicer arietinum* L.)

مهدی کاکایی*

استادیار گروه مهندسی کشاورزی (اصلاح نباتات و ژنتیک)، دانشگاه پیام‌نور

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۴/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۲/۱۷

چکیده

از جمله روش‌های مطالعه وجود تنوع ژنتیکی میان گونه‌های گیاهی، استفاده از روش الکتروفورز پروتئین‌های بذر می‌باشد. استفاده از نشانگرهای پروتئینی در جداسازی ارقام نخود به‌عنوان یک منبع ارزشمند غذایی مهم است. الگوی پروتئین‌های ذخیره‌ای چهار رقم نخود (آرمان، هاشم، ILC-482 و آزاد) با روش SDS-PAGE بررسی شد. برای این منظور از ژل ۱۲/۵ درصد پلی‌اکریل‌امید استفاده گردید. نتایج الکتروفورز نشان داد که تفاوت الگوی پروتئینی ارقام مورد مطالعه بیشتر مربوط به باندهای پروتئینی موقعیت ۱۷ و ۲۵ کیلو دالتون است. بر اساس نتایج SDS-PAGE، به‌طور میانگین ۲۸/۷۵ باند پروتئینی، در محدود ۱۴ تا ۱۰۰ کیلو دالتون شناسایی گردید. حضور باندهای پروتئینی با وزن تقریبی ۱۷ کیلو دالتون در الگوی پروتئینی ارقام ILC-482، هاشم و آزاد می‌تواند به‌عنوان نشانگرهای پروتئینی برای این ارقام و باند پروتئینی ۱۴ کیلو دالتون برای رقم آرمان معرفی شوند. دو رقم ILC-482 و آرمان و نیز هاشم، به‌ترتیب بیشترین و کمترین تعداد باند را داشتند و بیشترین فاصله ژنتیکی بین ارقام ILC-482 و آرمان مشاهده شد. ماتریس تشابه محاسبه و تجزیه خوشه‌ای بر اساس ضریب تشابه جاکارد به روش UPGMA انجام گردید. در رنگ‌آمیزی با کوماسی بلو دامنه ضرایب تشابه از ۰/۷۸ تا ۰/۸۷ متغیر بود. جهت تعیین همبستگی بین صفات زراعی و مولکولی از آزمون مانتل-هانزل (Mantel-Hansel) استفاده شد و همبستگی بین صفات زراعی در شرایط تنش خشکی و شرایط آبیاری تکمیلی با داده‌های مولکولی مشاهده گردید ($P \leq 5\%$). با بررسی شاخص‌های تنش خشکی و نتایج حاصل از بای‌پلات رقم آرمان به‌عنوان متحمل‌ترین رقم شناخته شد و در هر دو شرایط محیطی تنش خشکی و بدون تنش عملکرد بالاتری نسبت به سایر ارقام از خود بروز داد. همچنین تجزیه بای‌پلات نشان داد که شاخص‌های YI و HAM بهترین شاخص‌های تحمل به خشکی بودند.

واژه‌های کلیدی: آبیاری تکمیلی، آزمون مانتل، بای‌پلات، شناساگر پروتئینی، ضریب جاکارد

مقدمه

تا ۲۸/۱ درصد پروتئین خام، ۵۰ تا ۶۰ درصد انواع کربوهیدرات‌ها و تقریباً ۶ درصد روغن و مقدار قابل توجهی فسفر، آهن، کلسیم و ویتامین‌های مختلف، به‌عنوان جزء مهم غذایی در بین کشورهای توسعه‌یافته که به کیفیت رژیم غذایی خود اهمیت می‌دهند، مطرح است (Gupta & Agrawal, 1977). نخود را به مانند عدس، «گوشت فقرا» نامیده‌اند، چراکه تا حدودی می‌تواند جای خالی گوشت حیوانی را در یک برنامه غذایی سالم پر کند. به‌کارگیری نشانگرهای پروتئینی با کمک روش SDS-PAGE جهت شناسایی واریته‌ها، گونه‌ها و ارقام زراعی در گیاهان مختلف توسط محققان مورد توجه قرار گرفته است. پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه پیش از این نیز برای مطالعه در برخی از گیاهان زراعی مهم نظیر بذر پسته (Ehsanporet) (Abozaryghazafroodi et al., 2009) بذر برنج (Kakaei, 2006)، برگ کلزا تحت شرایط تنش خشکی و نرمال

نخود زراعی (*Cicer arietinum* L.) از تیره لگومینوزه، گیاهی خودگشن و یکساله است. در بین حبوبات نخود از لحاظ سطح زیرکشت و تولید، پس از لوبیا و عدس در رتبه سوم قرار دارد (Shobeiri et al., 2007). بر اساس آخرین آمارنامه (سال زراعی ۹۴-۱۳۹۳) در ایران نخود با سطح زیرکشت ۷۱۲۰۰۰ هکتار و تولید ۵۱۹ هزار تن، بخش وسیعی از کشت حبوبات را به خود اختصاص داده است (Iran's Agricultural Statistics, 2017). با توجه به مطالعات انجام‌شده، اثرات سوء حاصل از کمبود پروتئین و ویتامین‌های خاص را می‌توان به کمک حبوبات از جمله نخود تأمین کرد. نخود با دارا بودن ۱۲/۴

* نویسنده مسئول: همدان، اسدآباد، دانشگاه پیام‌نور مرکز اسدآباد، گروه کشاورزی دانشگاه پیام‌نور مرکز اسدآباد، تلفن: ۰۸۱۳۳۱۱۷۱۳۱، صندوق پستی: ۱۹۳۹۵-۴۶۹۷
mehdikakaei37@gmail.com

هستند (گروه C) و (۴) ژنوتیپ‌هایی که عملکرد پایینی را هم در شرایط تنش و هم بدون تنش دارند (گروه D). همچنین Fernandez (1992) ابراز کرد که بهترین معیار انتخاب برای تنش، معیاری است که بتواند گروه A را از سایر گروه‌ها تشخیص دهد. وی در مطالعه راه‌های شناسایی ژنوتیپ‌های گروه A، شاخص‌های تحمل به تنش STI و GMP را معرفی کرد. بالابودن مقادیر شاخص‌های GMP و STI برای یک رقم، نشان از تحمل بالا نسبت به خشکی و عملکرد بالقوه بالای آن رقم داشته و می‌تواند ژنوتیپ‌های گروه A را از ژنوتیپ‌های گروه‌های B و C شناسایی و تفکیک نماید (Fernandez, 1992). شاخص دیگر مورد استفاده، شاخص میانگین هارمونیک است. هرچقدر این شاخص بزرگ‌تر باشد، مطلوب‌تر خواهد بود (Mohammadi, et al., 2005). شاخص حساسیت به تنش (SSI) توسط Fischer & Maurer (1978) ارائه گردید که هرچقدر مقدار این شاخص کمتر باشد، نشان از تحمل بیشتر ارقام دارد. شاخص متوسط بهره‌وری (MP) را Rosielle & Hamblin (1981) معرفی نمود که متوسط تولید یک رقم را در دو محیط تنش و بدون تنش نشان می‌دهد. هرچه مقدار عددی این شاخص بزرگ‌تر باشد، ژنوتیپ مورد بررسی متحمل‌تر خواهد بود (Rosielle & Hamblin, 1981). شاخص تحمل به تنش (STI) به دلیل این که ژنوتیپ‌هایی را گزینش می‌کند که عملکرد بالایی در هر دو محیط تنش و بدون تنش دارند، معیار مناسبی برای گزینش ژنوتیپ‌های مقاوم به خشکی معرفی شده است. در خصوص شاخص تحمل (TOL) بایستی بیان کرد که مقادیر بالای آن بیانگر حساسیت بیشتر به خشکی بوده و مقادیر پایین این شاخص برای ما مطلوب است. با توجه به تغییرات بارندگی در سال‌ها و مناطق مختلف، انتخاب گیاهان متحمل به خشکی حیاتی است. Valizadeh et al, (2011) در مطالعه ارتباط صفات مهم اقتصادی با پروتئین‌های ذخیره‌ای در لوبیا ابراز نمودند که بررسی ارتباط صفات کمی با نوارهای پروتئینی و مقایسه میانگین دو گروه واجد و فاقد این نوارها با تجزیه واریانس و آماره چندمتغیره T^2 هتلینگ نشان داده که بین وجود و عدم وجود نوارهای پروتئینی در برخی صفات از جمله وزن ۱۰۰ دانه، تعداد دانه در نیام و سایر ویژگی‌های دانه و نیام اختلاف معنی‌دار وجود دارد. با توجه به اهمیت اقتصادی شناسایی و تشخیص ارقام مختلف خود، هدف از این مطالعه، بررسی الگوی بیان پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه چهار رقم (آرمان، هاشم، ILC-482 و آزاد) به منظور معرفی باندهای پروتئینی به عنوان نشانگر برای شناسایی و تفکیک این ارقام از یکدیگر و کشت آن عمدتاً به صورت دیم با روش SDS-PAGE است.

(et al., 2012)، برگ کلزا تحت تنش رژیم‌های سرمایی (Beyranvand et al., 2006)، برگ و بذر یونجه (Fareghi) (Iqbal et al., 2005; Hameed et al., 2007)، بذر نخود (Sadia et al., 2009) و بذر باقلا (Abd El-Zaher & Mustafa, 2007) استفاده شده‌اند. روابط فیلوژنتیکی در میان گونه‌های Cicer بر اساس داده‌های حاصل از الکتروفورز با روش SDS-PAGE توسط et al., Slinkard (1992)، انجام شده و Cicer reticulatum را نیای وحشی ارقام نخود معرفی نمودند. این گزارش‌ها کارآیی نشانگر پروتئینی را در ارزیابی تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌های گیاهی تأیید نموده و نشان داده که نشانگر پروتئینی به دلیل عدم تأثیرپذیری از شرایط محیطی اطلاعات تاکسونومیکی مفیدی را فراهم می‌نماید (SalehiShanjani et al., 2013). تکنیک SDS-PAGE، روشی ارزان، ساده و دقیق است که جهت آنالیز ساختار ژنتیکی ژرم پلاسما مورد استفاده قرار می‌گیرد. پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر به عنوان نشانگرهای ژنتیکی به چهار علت بررسی می‌شوند: ۱- آنالیز فاصله ژنتیکی درون و برون گونه‌ای، ۲- اهلی کردن گیاهان، اصلاح و حفاظت از منابع ژنتیکی، ۳- قرابت ژنتیکی و ۴- به عنوان وسیله‌ای برای توسعه محصولات (Ghafoor et al., 2002). پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه تا حدود زیادی مستقل از نوسانات محیطی هستند و برای مطالعه تنوع‌های ژنتیکی، مطلوب‌تر از پروتئین‌های رویشی هستند (Gepts, 1989; Razavizadeh & Ehsanpour, 2013). در مطالعات طبقه‌بندی از الگوهای الکتروفورزی پروتئین‌های ذخیره‌ای استفاده می‌شود. هر یک از باندهای ایجاد شده در ژل الکتروفورز به عنوان صفتی مجزا مورد بررسی قرار می‌گیرند (Raeesilehri et al., 2015). در تحقیقی روی برنج، Abozaryghazafroodi et al, (2006) ارقام برنج را با استفاده از داده‌های الکتروفورزی SDS-PAGE پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه و داده‌های صفات کمی گروه‌بندی کرده و ابراز داشتند که گروه‌بندی بر اساس باندهای پروتئینی مانند تجزیه خوشه‌ای بر مبنای صفات زراعی تا حدود زیادی قادر به تفکیک ارقام بومی از سایر ارقام بود و همچنین داده‌های حاصل از الکتروفورز به میزان زیادی توانایی تکمیل داده‌های مورفولوژیکی را داشته و می‌توانند مکمل هم باشند. بر اساس نظر Fernandez (1992)، ژنوتیپ‌ها بر اساس پاسخ عملکرد آن‌ها به شرایط تنش می‌توانند به چهار گروه طبقه‌بندی شوند: ۱) ژنوتیپ‌هایی که عملکرد بالایی در شرایط تنش و هم در شرایط بدون تنش داشته باشد (گروه A)، ۲) ژنوتیپ‌هایی که عملکرد بالایی را تنها در شرایط بدون تنش دارند (گروه B)، ۳) ژنوتیپ‌هایی که عملکرد بالایی را تنها در شرایط تنش دارا

رنگ نشانگر به انتهای ژل ادامه یافت. بعد از الکتروفورز، رنگ آمیزی به مدت دو ساعت با کوماسی بلو بریلیانت R-250 انجام و سپس ژل با محلول رنگ‌بری تیمار شده و در نهایت ژل‌ها اسکن شدند. از پروتئین‌های اوترانسفرین (۷۸ کیلودالتون)، آلبومین گاوی (۶۶ کیلودالتون)، اوآلبومین (۴۵ کیلودالتون)، اکتینیدین (۲۹ کیلودالتون)، بتا-لاکتوگلوبولین (۱۸ کیلودالتون) و لیزوزیم (۱۴ کیلودالتون) به‌عنوان مارکر در ژل استفاده گردید. به منظور تجزیه و تحلیل آماری باندهای پروتئینی، ابتدا تعداد باندها مشخص گردید. وزن مولکولی پروتئین‌های مورد مطالعه با تعیین مقادیر حرکت نسبی (R_f) برای باندهای پروتئینی و مقایسه با نمودار استاندارد وزن مولکولی تعیین گردید.

خصوصیات طرح آزمایشی و عملیات زراعی

به منظور تعیین مناسب‌ترین شاخص‌های تحمل به خشکی در چهار رقم نخود، آزمایش در سال زراعی ۸۹-۱۳۸۸ در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار و در دو بخش، تنش خشکی و شرایط آبیاری تکمیلی، در مزرعه آزمایشی و آزمایشگاه گروه کشاورزی دانشگاه پیام‌نور مرکز اسدآباد اجرا گردید. هر کرت شامل ۵ خط کاشت به طول ۲ متر با فواصل خطوط ۴۰ سانتی‌متر و فواصل بین بوته در روی ردیف، ۶ سانتی‌متر بودند. عملیات تهیه زمین شامل شخم، دیسک و ایجاد فارو بود. کاشت به‌صورت دستی در اواخر اسفندماه صورت پذیرفت. آبیاری در بخش شرایط آبیاری تکمیلی در مرحله پایان گل‌دهی صورت گرفت، در حالی‌که در بخش تنش خشکی، در مرحله انتهای گل‌دهی آبیاری صورت نگرفت. مبارزه با علف‌های هرز به صورت دستی و در مرحله قبل از گل‌دهی صورت پذیرفت. برای انجام یادداشت‌برداری‌ها از هر ژنوتیپ در هر تکرار ۵ بوته به تصادف انتخاب گردید. برای محاسبه صفت عملکرد دانه، یک مترمربع از هر کرت برداشت گردید. جهت اندازه‌گیری طول و عرض نیام، تعداد هشت نیام به تصادف انتخاب و برای اندازه‌گیری صفت تعداد بوته در مترمربع، یک مترمربع از هر کرت در نظر گرفته شد. برداشت نهایی هر کرت، موقعی صورت گرفت که بیش از ۹۰ درصد نیام‌ها رنگ زرد متمایل به قهوه‌ای به خود گرفته بودند و بر مبنای حذف اثر حاشیه‌ای در هر کدام از آزمایشات آبی و دیم انجام گردید.

همچنین بر اساس فراگیری شرایط کم‌آبی در کشور و با توجه به اهمیت نخود در بین حبوبات در ایران و ناحیه تحقیق، مطالعه صفات زراعی مهم و در نتیجه شناسایی مناسب‌ترین رقم بر اساس شاخص تحمل به خشکی در ارقام مذکور و ارتباط بین صفات کمی و الگوی باند پروتئینی ارقام، از جمله اهداف دیگر مطالعه حاضر بودند.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از چهار رقم نخود زراعی با نام‌های هاشم، آرمان، ILC-482 و آزاد، تهیه شده از معاونت مؤسسه تحقیقات دیم در سرارود کرمانشاه جهت مطالعه الگوی پروتئین‌های بذر و شناسایی رقم متحمل به خشکی در منطقه تحقیق (مزرعه آموزشی-تحقیقاتی دانشگاه پیام‌نور مرکز اسدآباد) استفاده شد. به منظور استخراج پروتئین‌های کل بذر، ابتدا بذرهای در هاون چینی به خوبی کوبیده شد و سپس ۲۰ میلی‌گرم از پودر به‌دست‌آمده از بذر هر رقم با ۲ میلی‌لیتر بافر استخراج (تریس ۵۰ میلی‌مولار با pH=8.5 حاوی EDTA، ۱ میلی‌مولار PMSF، ۱ میلی‌مولار $MgCl_2$ ، ۲۰ میلی‌مولار، ۰/۲ درصد NP-40 و ۲ درصد 2-Mercaptoethanol) مخلوط گردید. به مخلوط حاصل پس از دو ساعت نگهداری در یخچال به مقدار دو میلی‌لیتر استون سرد حاوی ۱۰ درصد TCA^۱ اضافه شده و پس از دو ساعت نگهداری در فریزر به مدت ۱۵ دقیقه در $-20^{\circ}C$ سانتریفیوژ گردید. از پودر نسبتاً سفید به‌دست‌آمده، جهت الکتروفورز استفاده شد {Jinghui et al., 2006} با بعضی تغییرات.

آماده‌سازی ژل الکتروفورز: در این مطالعه از تکنیک SDS-PAGE (الکتروفورز با ژل پلی‌اکریل‌امید با حضور سدیم دو سیل سولفات) {Laemmli, 1970} با کمی تغییرات^۲ استفاده گردید. مقدار پروتئین نیز با استفاده از روش Bradford (1976) ارزیابی شد. ژل‌های جداکننده (ژل پایین) و متراکم‌کننده (ژل بالا) به ترتیب با غلظت‌های ۱۲/۵ و ۵ درصد، بهترین نسبت‌ها برای تفکیک مناسب باندهای پروتئینی تشخیص داده شد. از پروتئینی که دارای غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود، ۱۰ میکرولیتر از پروتئین استخراجی جهت الکتروفورز با سرنگ هامیلتون در داخل چاهک‌ها قرار گرفت. الکتروفورز با شدت جریان ۵۰ ولت برای حرکت پروتئین‌ها در ژل بالا (۰/۵ ساعت) و جریان ۱۵۰ ولت برای حرکت پروتئین‌ها در ژل جداکننده (۱/۵ ساعت) تا رسیدن

^۲ Relative factor

^۱ Tricolor acetic acid

تاریخ نیامدهی

این صفت فنولوژی نیز با توجه به بازدهی‌های مزرع‌های و بر اساس ۵۰ درصد نیامدهی بوته‌ها محاسبه گردید. در هر کرت هشت بوته به صورت تصادفی انتخاب و تعداد نیام در آن‌ها شمارش گردید و میانگین آن‌ها محاسبه شد. برای تعداد شاخه‌های فرعی هشت بوته به صورت تصادفی انتخاب و میانگین آن‌ها محاسبه شد. ارتفاع از سطح زمین تا آخرین قسمت برگ انتهایی برای هشت بوته مورد نظر در هر کرت اندازه‌گیری گردید. طول دوره پُرشدن دانه نیز با شمارش روز از مدت زمان تشکیل نیام تا زمان رسیدگی محاسبه گردید.

محاسبه شاخص‌های تحمل به خشکی

به منظور بررسی ارقام از نظر واکنش به تنش خشکی، پس از تعیین عملکرد دانه در هر دو شرایط محیطی (تنش خشکی و آبیاری تکمیلی) اقدام به محاسبه شاخص‌های تحمل به خشکی به شرح زیر گردید (Fischer & Maurer, 1978; Rosielle & Hamblin, 1981; Bouslama & Fernandez Schapaugh, 1984; Hossein et al., 1990 & 1992).

$$1\text{-شاخص تحمل} \quad TOL = YP - YS \quad (TOL^1)$$

$$2\text{-شاخص حساسیت به تنش} \quad SSI^2$$

$$SSI = 1 - (YS/YP)/SI$$

$$SI = 1 - \bar{YS} / \bar{YP}$$

در این فرمول، SI^3 شدت تنش می‌باشد.

۳- میانگین هارمونیک

$$HAM = 2(YP * YS) / (YP + YS) \quad (HAM^4)$$

$$4\text{-شاخص عملکرد} \quad YI = YS / \bar{YS} \quad (YI^5)$$

۵- شاخص میانگین هندسی بهره‌وری

$$GMP = (YS * YP) / 2 \quad (GMP^6)$$

$$6\text{-شاخص پایداری عملکرد} \quad YSI = (YS/YP) \quad (YSI^7)$$

$$7\text{-شاخص تحمل به تنش} \quad STI = (YP * YS) / YP \quad (STI^8)$$

$$8\text{-میانگین حسابی عملکرد} \quad MP = (YS + YP) / 2 \quad (MP^9)$$

YP: عملکرد هر ژنوتیپ در محیط بدون تنش، YS:

عملکرد هر ژنوتیپ در محیط تنش، YS: میانگین عملکرد کلیه

ژنوتیپ‌ها در محیط تنش، YP: میانگین عملکرد کلیه ژنوتیپ‌ها در محیط بدون تنش، SI: شدت تنش.

تجزیه خوشه‌ای و آنالیز آماری

جهت مطالعه و آنالیزهای آماری چندمتغیره نظیر تجزیه خوشه‌ای در هر نمونه بر اساس وجود باند (کد ۱) یا فقدان باند (کد ۰)، هر باند پروتئینی کددهی شده و باندهای پروتئینی به‌عنوان صفات کیفی در نظر گرفته شدند. از مطالعات عینی به منظور تعیین موقعیت هر باند پروتئینی در SDS-PAGE استفاده شد. جهت تعیین میزان شباهت میان گونه‌های بررسی شده از ضریب تشابه جاکارد^{۱۰} استفاده گردید. بر اساس حضور و غیاب باندها و با تحلیل خوشه‌ای UPGMA (Sneath & Sokal, 1973) و استفاده از ضریب روابط خویشاوندی ارقام خود با استفاده از نرم‌افزار NTSYS، SPC2 ارزیابی گردید و با کمک آزمون ماننل همبستگی بین صفات کمی و داده‌های کیفی (حاصل از الگوی باند پروتئینی) مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت رسم منحنی بای‌پلات و اشکال سه‌بعدی از نرم‌افزار SPSS Ver. 16 و محاسبه شاخص‌ها از نرم‌افزار MSTAT-C استفاده گردید.

نتایج و بحث

اگرچه بسیاری از باندها در بسیاری از ارقام وجود داشتند و لیکن میزان تراکم پروتئین بعضی باندها در برخی ارقام متفاوت بود. بر اساس نتایج، به‌طور میانگین ارقام دارای حداقل ۲۸/۷۵ باند (شامل باند ضعیف و قوی) بودند. رقم هاشم در محدوده ۲۵ کیلوالتونی دارای یک باند ضعیف نسبت به سایر ارقام در این محدوده بود و سایر ارقام، این باند پروتئینی را با شدت بیشتری داشتند. در محدوده ۱۷ کیلوالتونی، ارقام آرمان و ILC-482 دارای باند پروتئینی ضعیفی نسبت به سایر ارقام در همین محدوده بودند که به نظر می‌رسد این تفاوت‌ها در مطالعات الکتروفورز دو بعدی مشهودتر باشد. در مطالعه‌ای Hameed et al, (2009) محدود وزن مولکولی پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر ژنوتیپ‌های نخود کابلی را در ژل SDS-PAGE بین ۲۵ تا ۱۰۸ کیلوالتون بررسی و تعداد باندها را ۲۰ تا ۲۲ باند گزارش کردند. در مطالعه‌ای Iqbal et al, (2005) پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر واریته‌های نخود با تکنیک الکتروفورز تک‌بعدی ۱۲ باند پروتئینی را با محدوده وزن مولکولی ۲۴ تا ۶۶ کیلوالتون گزارش کردند. نتایج تحقیقات آن‌ها نشان داد که در الگوی پروتئینی تفاوت چشمگیری قابل مشاهده نیست و تفاوت در باندها بسیار جزئی می‌باشد.

^۱ TOL: Tolerance

^۲ SSI: Stress Susceptibility Index

^۳ SI: Stress Intensity

^۴ HAM: Harmonic Mean

^۵ YI: Yield Index

^۶ GMP: Geometric Mean Productivity

^۷ YSI: Yield Stability Index

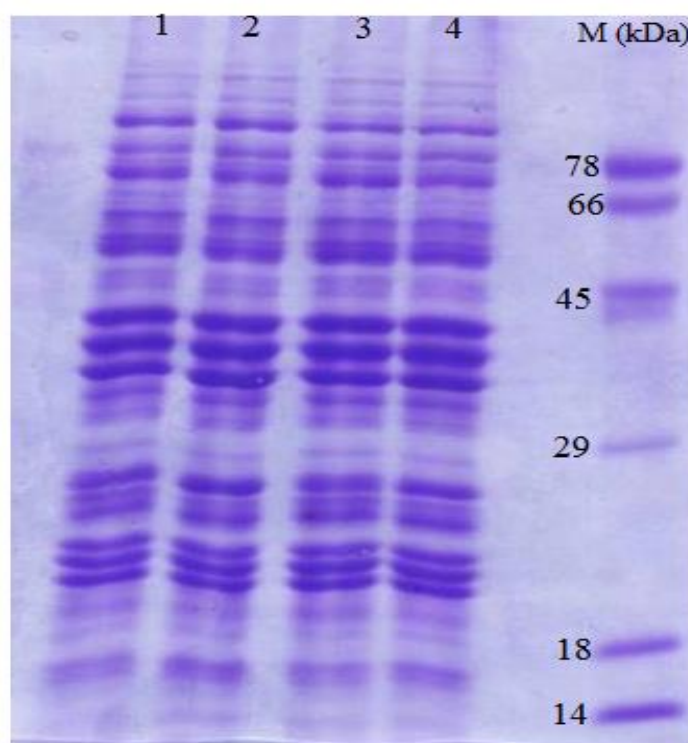
^۸ STI: Stress Tolerance Index

^۹ MP: Mean Productivity

^{۱۰} Jaccard Coefficient

کاملاً متفاوت بودند (شکل ۱). رقم ILC-482 و آرمان و هاشم به ترتیب بیشترین و کمترین تعداد باند را داشتند و بیشترین فاصله ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های ILC-482 و آرمان بود (شکل ۲). در رنگ‌آمیزی با کوماسی بلو دامنه ضرایب تشابه از ۰/۷۸ تا ۰/۸۷ متغیر بود (جدول ۱). در شرایط تنش خشکی بیشترین تشابه بین ارقام آزاد و ILC-482 (۰/۳) و در شرایط شرایط آبیاری تکمیلی بین ارقام آزاد و هاشم (۰/۵۵) مشاهده گردید (جدول ۲ و ۳). جهت تعیین همبستگی بین صفات زراعی و مولکولی از آزمون مانتل-هانزل (Mantel-Haenszel) استفاده گردید که همبستگی معنی‌داری بین صفات زراعی در شرایط تنش خشکی و شرایط آبیاری تکمیلی با داده‌های مولکولی در سطح احتمال ۵ درصد نشان داد. به عبارتی تنوع موجود در سطح مزرعه تنوع موجود در سطح داده‌های مولکولی را تأیید کرد. نتایج موجود در این مطالعه با نتایج Kakaeiet *al.*, (2009) در ژنوتیپ‌های کلزا همخوانی داشت.

پیشنهاد مؤلفان بر این است که پروتئین‌های بذر و قسمت‌های رویشی در مراحل رشدی مختلف با الکتروفورز در دو بعد همراه با ژنوتیپ‌های بیشتری جهت بررسی تنوع و برنامه‌های به‌نژادی مورد ارزیابی و بررسی قرار گرفته و برای نتایج بهتر و با تنوع بیشتر، از نشانگرهای DNA نیز استفاده و نتایج با یکدیگر مورد ارزیابی قرار گیرند. نتایج این مطالعه بیشتر تفاوت در تعداد باندها را نشان می‌دهد. پروتئین‌های ذخیره‌ای ضمن داشتن چندشکلی زیاد، بسیار باثبات هستند، بنابراین الگوی الکتروفورزی پروتئین ذخیره بذر به تنهایی یا با سایر نشانگرها معیار مطلوبی جهت شناسایی جمعیت‌های گیاهی خواهد بود (Lawrence *et al.*, 1987). در تحقیقی نیز Mukhlesur & Hirata, (2004) فاصله ژنتیکی گونه‌های مختلف کلزا را بر اساس الگوی باندهای SDS-PAGE بذر و برگ، مطالعه و تنوع باندهای بین آن‌ها را گزارش کردند. بر اساس نتایج این تحقیق، ۱۶ باند متفاوت روی صفحه ژل آکریل آمید ظاهر شد. الگوی نواری پروتئین‌ها در برخی گروه‌های مشابه و در برخی دیگر



شکل ۱- الگوی نواری پروتئین‌های بذر نخود با استفاده از SDS-PAGE

(۱) رقم ILC-482، (۲) آزاد، (۳) رقم آرمان و (۴) رقم هاشم

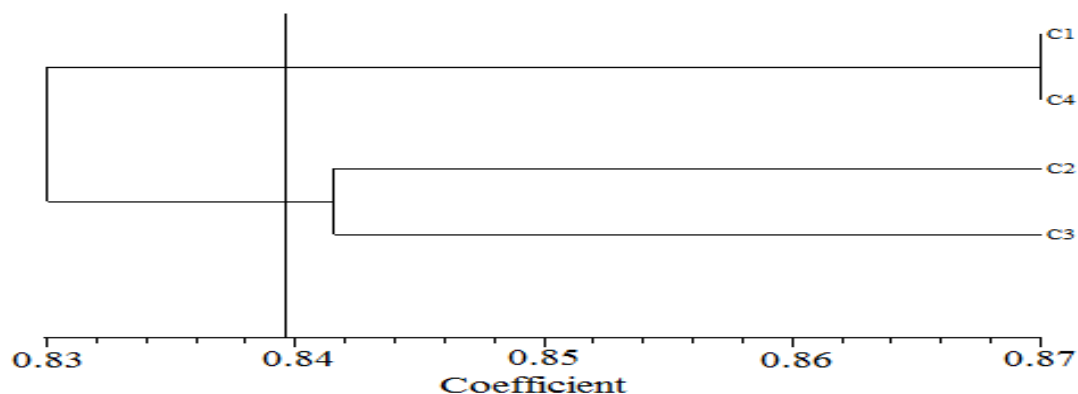
Fig. 1. Chickpea protein banding patterns using SDS-PAGE

(1) ILC-482, (2) Azad, (3) Arman, (4) Hashem

جدول ۱- ضریب تشابه جاکارد بر اساس ویژگی‌های الکتروفورزی پروتئین بذر در چهار رقم نخود

Table 1. Jaccard's similarity matrix based on protein marker (Molecular Data)

	ILC-482	Azad	Arman	Hashem
ILC-482	1			
Azad	0.8	1		
Arman	0.78	0.83	1	
Hashem	0.87	0.87	0.84	1



شکل ۲- دندروگرام حاصل از تحلیل داده‌های الکتروفورزی بر اساس باندهای پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه ارقام نخود با روش UPGMA (۱) رقم ILC-482، (۲) آزاد، (۳) رقم آرمان و (۴) رقم هاشم

Fig. 2. Dendrogram for *Cicer arietinum* cultivars based on SDS-PAGE markers via UPGMA method

(1) ILC-482, (2) Azad, (3) Arman, (4) Hashem

جدول ۲- ماتریس تشابه جاکارد بر اساس داده‌های زراعی ارقام نخود در شرایط تنش خشکی

Table 2. Jaccard's similarity matrix of chickpea cultivars based on agronomy data in drought stress condition

	ILC-482	Azad	Arman	Hashem
ILC-482	1			
Azad	0.30	1		
Arman	0.0	0.20	1	
Hashem	0.143	1	0.166	1

جدول ۳- ماتریس تشابه جاکارد بر اساس داده‌های زراعی ارقام نخود در شرایط آبیاری تکمیلی

Table 3. Jaccard's similarity matrix of chickpea cultivars based on agronomy data in supplementary irrigation

	ILC-482	Azad	Arman	Hashem
ILC-482	1			
Azad	0.166	1		
Arman	0.0	0.25	1	
Hashem	0.2	0.55	0.143	1

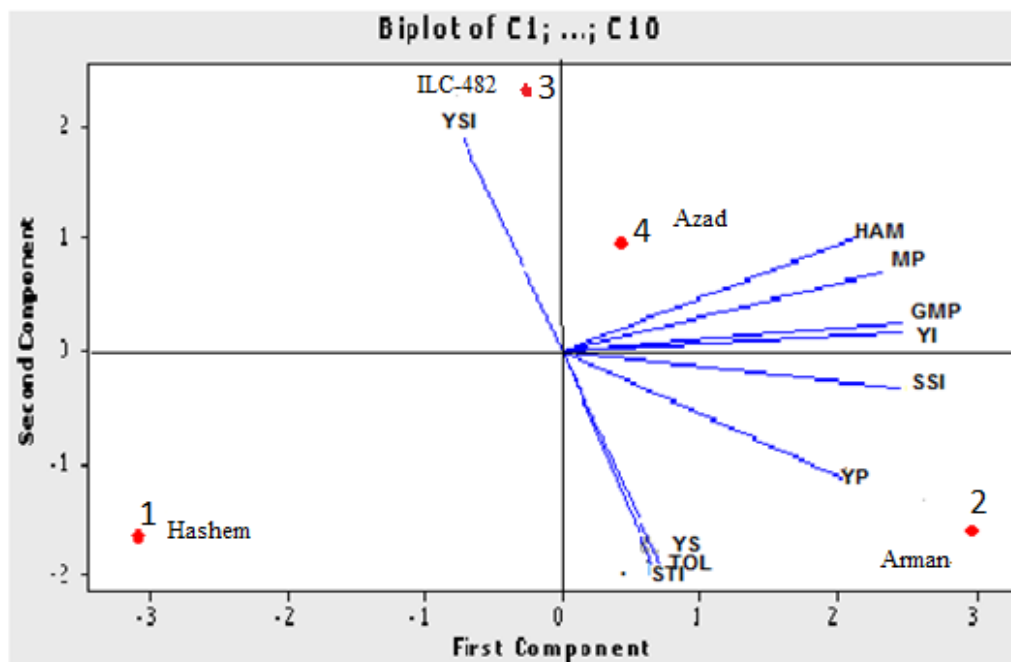
شرایط محیطی را نشان می‌دهد. رقم آرمان در ناحیه چهارم قرار دارد که دارای مقدار بالای مؤلفه اول و مقدار کم مؤلفه دوم می‌باشد که این خصوصیت در جدول ۴ نیز مشهود است. رقم آزاد در ناحیه یک بای پلات قرار دارد که دارای میزان بالای مؤلفه اول و دوم می‌باشد که به‌عنوان مثال در مورد شاخص HAM در جدول ۴، بر اساس هر دو مؤلفه میزان بالایی را به خود اختصاص داده است. در خصوص رقم ILC-482 که در

بای پلات شاخص‌های تحمل به خشکی

در بررسی بای پلات شاخص‌های تحمل به خشکی، ارقام نسبت به هم تنوع و فاصله دارند و ارقام آرمان و آزاد نسبت به دو رقم هاشم و ILC-482 تقریباً مجاور شاخص‌های تحمل به خشکی قرار دارند (شکل ۳) که نشان از حفظ عملکرد آن‌ها در شرایط تنش خشکی است. جدول ۴، مقادیر ویژه، سهم جمعی و بردارهای ویژه شاخص‌های تحمل به خشکی و عملکرد در دو

گردید. در مطالعه شاخص‌های خشکی استفاده از بای‌پلات توسط محققان بسیاری گزارش گردیده است (Abolhassani Farshadfar & Shutka, 2003; & Saeidi, 2006) که نشان‌دهنده اهمیت مطالعه شاخص‌های تحمل خشکی می‌باشد.

ناحیه دوم بای‌پلات قرار گرفته است، دارای میزان بالای مؤلفه دوم (۰/۴۹۰) و میزان کم مؤلفه اول (۰/۱۱۵-) می‌باشد که در جدول ۴ نیز مشهود است. از نمودار چندمتغیره بای‌پلات که امکان مطالعه رابطه بیش از سه متغیر را به صورت همزمان فراهم می‌آورد نیز به منظور گزینش دقیق‌تر ژنوتیپ‌ها استفاده



شکل ۳- نمایش بای‌پلات شاخص‌های مورد مطالعه در ارقام نخود براساس مؤلفه‌های اصلی اول و دوم

Fig. 3. View Biplot indices in chickpea cultivars based on main elements of the first and second (HAM: Harmonic Mean; YI: Yield Index; GMP: Geometric Mean Productivity; YSI: Yield Stability Index; STI: Stress Tolerance Index; TOL: Tolerance; YS: Yield Stress; YP: Yield Potential; SSI: Stress Susceptibility Index; MP: Mean productivity)

جدول ۴- مقادیر ویژه، سهم تجمعی و بردارهای ویژه شاخص‌های تحمل به خشکی و عملکرد در دو شرایط محیطی

Table 4. Eigen values and eigenvectors cumulative share index of drought tolerance and yield in both conditions

مؤلفه Component	مقادیر ویژه Eigen values	سهم تجمعی Eigenvectors cumulative	SSI	MP	HAM	YI	STI	YSI	GMP	TOL	YS	YP
1	61.709	0.617	0.115	0.397	0.375	0.344	0.401	-0.115	0.399	0.106	0.344	0.328
2	38.274	0.383	-0.490	-0.088	0.184	0.265	0.046	0.490	0.068	-0.493	0.265	-0.297
3	0.0017	0	-0.156	0.305	-0.691	0.261	0.145	0.156	-0.390	0.085	0.261	0.254

(HAM: Harmonic Mean; YI: Yield Index; GMP: Geometric Mean Productivity; YSI: Yield Stability Index; STI: Stress Tolerance Index; TOL: Tolerance; YS: Yield Stress; YP: Yield Potential; SSI: Stress Susceptibility Index; MP: Mean productivity)

عملکرد ژنوتیپ‌ها در شرایط تنش و شرایط آبیاری تکمیلی را به‌عنوان معیارهای مناسب برای تحمل به خشکی پیشنهاد نموده‌اند (Blum, 1988; Ganjeali *et al.*, 2008). با توجه به این که شاخص‌های YI و HAM همبستگی مثبت و بسیار بالایی با عملکرد در شرایط تنش نشان دادند، می‌توان از این شاخص‌ها به‌عنوان معیارهای مناسب برای گزینش ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی بهره گرفت (Blum, 1988; Elshazly & Warboys, 1989).

همبستگی شاخص‌های تحمل به خشکی

جدول ۵ همبستگی شاخص‌های تحمل به خشکی را با یکدیگر نشان می‌دهد. شاخص‌های YI و HAM همبستگی مثبت (به ترتیب ۱ و ۰/۹۸۴) با عملکرد در شرایط تنش دارند، همچنین شاخص HAM همبستگی مثبت با عملکرد در شرایط تنش خشکی دارد (۰/۹۸۴). شاخص SSI همبستگی مثبت با TOL و همبستگی منفی با YSI داشته و MP نیز همبستگی مثبتی با GMP و STI دارد. محققان وضعیت نسبی

جدول ۵- ضرایب همبستگی شاخص‌های تحمل به خشکی

Table 5. Correlation coefficient drought stress tolerance index

	YP	YS	TOL	GMP	YSI	STI	YI	HAM	MP	SSI
YP	1									
YS	0.394	1								
TOL	0.775	-0.275	1							
GMP	0.730	0.916	0.134	1						
YSI	-0.790	0.252	-1**	-0.157	1					
STI	0.758	0.898	0.175	0.999*	-0.199	1				
YI	0.394	1**	-0.275	0.916	0.252	0.898	1			
HAM	0.549	0.984*	-0.102	0.972*	0.078	0.961*	-0.984*	1		
MP	0.902	0.753	0.425	0.953*	-0.447	0.966*	0.753	0.856	1	
SSI	0.790	-0.252	1**	0.157	-1**	0.199	-0.252	-0.078	0.447	1

*, **: Significant at 0.05 and 0.01 levels, respectively

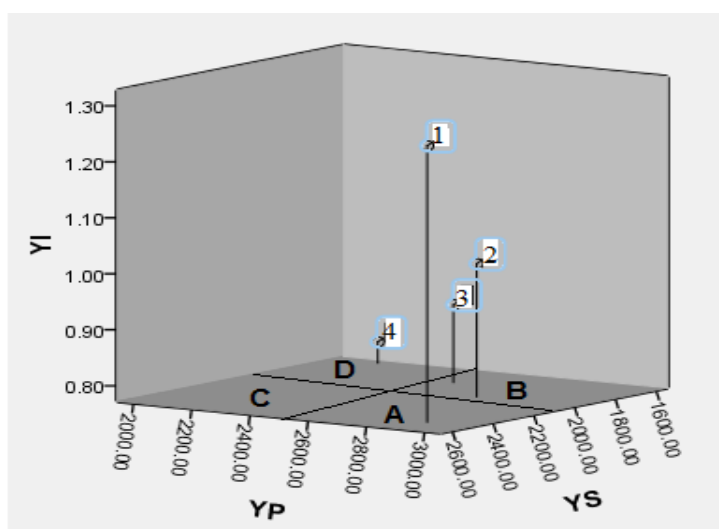
*, **: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵درصد و ۱درصد

(HAM: Harmonic Mean; YI: Yield Index; GMP: Geometric Mean Productivity; YSI: Yield Stability Index; STI: Stress Tolerance Index; TOL: Tolerance; YS: Yield Stress; YP: Yield Potential; SSI: Stress Susceptibility Index; MP: Mean productivity)

وسيله كشیدن خطوط متقاطع به چهار گروه A، B، C و D تقسیم گردید. بر اساس شاخص عملکرد (YI) رقم آرمان در گروه A نمودار قرار گرفت و از نظر شاخص‌های تحمل و پاسخ به خشکی برتر از سایرین بود. همچنین تحت هر دو شرایط تنش و بدون تنش خشکی عملکرد بالایی تولید کرده است که به‌عنوان ژنوتیپ کاندیدا برای تحمل به خشکی پیشنهاد می‌شود (نمودار سه‌بعدی بر اساس شاخص YI ذکر شده‌اند). استفاده از نمودار پراکنش سه‌بعدی برای گزینش ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی در مطالعات مختلف، تأیید شده است از جمله در کلزا (Kakaeiet al., 2009 و نخود (Farshadfar & Farshadfar, 2003).

گزینش بهترین ژنوتیپ‌های تحمل به خشکی

نمودار پراکنش سه‌بعدی، رابطه بین سه متغیر عملکرد در شرایط تنش (YS) و بدون تنش (YP) و نیز شاخص‌های تحمل به خشکی را بیان می‌نماید (شکل ۴). برای گزینش ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی با عملکرد بالا در هر دو محیط از نمودار سه‌بعدی استفاده گردید که در آن عملکرد در محیط تنش روی محور Xها، عملکرد در محیط شرایط آبیاری تکمیلی روی محور Yها و یکی از شاخص‌های انتخاب‌شده روی محور Zها نمایش داده شد. برای نشان‌دادن روابط بین این سه متغیر و جدانمودن ژنوتیپ‌های گروه A از گروه‌های دیگر (B، C و D) و همچنین تشخیص سودمندی شاخص مورد نظر به‌عنوان معیاری برای انتخاب ژنوتیپ‌های پرمحصول و متحمل خشکی، سطح X-Y به



شکل ۴- گزینش ژنوتیپ‌ها بر اساس مدل فرناندز توسط شاخص YI

۱- آرمان، ۲- آزد، ۳- ILC-482 و ۴- هاشم

Fig. 4. Selection of genotypes based on Fernandez method the index YI

1- Arman, 2- Azad, 3- ILC-482 and 4- Hashem

همبستگی صفات در شرایط تنش خشکی

جدول ۶، همبستگی صفات در شرایط تنش خشکی را نمایش می‌دهد. همان‌طور که از جدول مذکور نمایان است، صفت عرض کانوپی همبستگی منفی (۰/۹۹۶-) و نسبتاً بالایی با صفت تعداد شاخه فرعی دارد. همچنین صفت عرض کانوپی دارای همبستگی منفی (۰/۹۶۳-) با صفت عرض نیام می‌باشد. صفت درصد پوکی نیام با عملکرد دانه در شرایط تنش خشکی دارای همبستگی مثبت (۰/۹۷۳+) نسبتاً بالایی است؛ به عبارت دیگر در شرایط خشک، درصد پوکی نیامها زیاد است و گرده افشانی ضعیفی صورت گرفته است. صفت تعداد نیام دوبرذری با صفت وزن ۱۰۰ دانه دارای همبستگی منفی زیادی است (۰/۹۵۱-) که بیان می‌کند هرچه نیامها دارای دانه بیشتری باشند، به دنبال آن، وزن هر کدام از دانه‌ها کاهش می‌یابد. صفت روز تا نیام‌دهی کامل دارای همبستگی منفی نسبتاً بالایی با صفت تعداد نیام در بوته می‌باشد (۰/۹۶۵-) که در شرایط تنش خشکی گیاه رشد زایشی را جلوتر انداخته و سعی در

تولید دانه (هر چند با عملکرد کمتر) و نهایتاً حفظ بقاء را دارد. بین سایر صفات همبستگی مشاهده نگردید.

همبستگی صفات در شرایط بدون تنش (اعمال آبیاری تکمیلی) صفت عرض نیام همبستگی مثبت و بالایی (۰/۹۵۱) با صفت ارتفاع بوته داشت (جدول ۷)، چرا که هر چه ارتفاع بیشتر باشد، بوته و نهایتاً نیام فرصت بزرگ‌تر شدن را پیدا می‌کند. همچنین صفت وزن ۱۰۰ دانه همبستگی مثبت و بالایی (۰/۹۹۴) با عملکرد دانه در شرایط کنترل داشت، زیرا وزن ۱۰۰ دانه یکی از اجزای اصلی عملکرد دانه است. صفت روز تا نیام‌دهی کامل با صفت درصد پوکی نیام همبستگی همسو و مثبتی (۰/۹۶۹) داشتند. احتمالاً افزایش روز تا نیام‌دهی کامل باعث تغییرات در ژنتیک نیام شده و باعث عدم شکل‌گیری دانه در نیام و نهایتاً پوکی آن‌ها شده است. پس احتمالاً هر چقدر روز تا نیام‌دهی کامل بیشتر باشد، گیاه به علت افزایش تعداد نیام قادر به پر کردن همه نیامها نخواهد بود. بین سایر صفات همبستگی خاصی ملاحظه نگردید.

جدول ۶- ضریب همبستگی ساده بین صفات زراعی مورد مطالعه در ارقام نخود در شرایط تنش خشکی

Table 6. Correlation coefficient between agronomy traits in *Cicer arietinum* cultivars under study in drought stress condition

	Pod width	Pod length	Width canopy	100 Seed weight	Percent of pod null	Number of 2seed pod
	عرض نیام	طول نیام	عرض کانوپی	وزن ۱۰۰ دانه	درصد پوکی نیام	تعداد نیام دوبرذری
عملکرد دانه در شرایط تنش خشکی	Seed yield in drought stress condition					
تعداد شاخه فرعی	Number of sub branch					
تعداد نیام در گیاه	Number of pod in plant					
ارتفاع گیاه	Plant height					
تعداد گیاه در مترمربع	Number of plant.m ²					
عرض نیام	Pod width	1				
طول نیام	Pod length	0.441	1			
عرض کانوپی	Width canopy	-0.963*	0.236	1		
وزن ۱۰۰ دانه	100 Seed weight	-0.405	-0.943	-0.266	1	
درصد پوکی نیام	Percent of pod null	0.233	-0.013	0.089	0.336	1
تعداد نیام دوبرذری	Number of 2seed pod	0.104	0.865	-0.025	-0.951*	-0.474
روز تا نیام‌دهی کامل	Day to complete podding	0.441	-0.143	0.641	-0.130	-0.634

* و **: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد

* & **: Significant at 0.05 and 0.01 levels, respectively.

ادامه جدول ۶- ضریب همبستگی ساده بین صفات زراعی مورد مطالعه در ارقام نخود در شرایط تنش خشکی
Continue the Table 6. Correlation coefficient between agronomy traits in *Cicer arietinum* cultivars under study in drought stress condition

	Seed yield in drought stress condition عملکرد دانه در شرایط تنش خشکی	Number of sub branch تعداد شاخه فرعی	Number of pod in plant تعداد نیام در گیاه	Plant height ارتفاع گیاه
عملکرد دانه در شرایط تنش خشکی	Seed yield in drought stress condition	1		
تعداد شاخه فرعی	Number of sub branch	-0.189	1	
تعداد نیام در گیاه	Number of pod in plant	0.424	0.678	1
ارتفاع گیاه	Plant height	0.609	-0.875	-0.421
تعداد گیاه در مترمربع	Number of plant.m ⁻²	-0.154	-0.689	-0.945
عرض نیام	Pod width	0.438	-0.943	-0.395
طول نیام	Pod length	0.159	-0.228	0.370
عرض کانوپی	Width canopy	0.278	-0.996**	-0.625
وزن ۱۰۰ دانه	100 Seed weight	0.155	0.289	-0.126
درصد پوکی نیام	Percent of pod null	-0.973*	0.002	0.495
تعداد نیام دوبذری	Number of 2seed pod	-0.344	-0.009	0.240
روز تا نیام‌دهی کامل	Day to complete podding	-0.524	-0.705	-0.965*

* و **: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد

* & **: Significant at 0.05 and 0.01 levels, respectively.

جدول ۷- ضریب همبستگی ساده بین صفات زراعی مورد مطالعه در ارقام نخود در شرایط کنترل (اعمال آبیاری تکمیلی)
Table 7. Correlation coefficient between agronomy traits in *Cicer arietinum* cultivars under study in control condition

	Pod width عرض نیام	Pod length طول نیام	Width canopy عرض کانوپی	100 Seed weight وزن ۱۰۰ دانه	Percent of pod null درصد پوکی نیام	Number of 2seed pod تعداد نیام دو بذری
عملکرد دانه در شرایط آبیاری تکمیلی	Seed Yield in supplementary irrigation condition					
تعداد شاخه فرعی	Number of sub branch					
تعداد نیام در گیاه	Number of pod in plant					
ارتفاع گیاه	Height plant					
تعداد گیاه در مترمربع	Number of plant					
عرض نیام	Pod width	1				
طول نیام	Pod length	0.637	1			
عرض کانوپی	Width canopy	0.771	0.073	1		
وزن صد دانه	Hundred seed weight	-0.840	-0.664	-0.729	1	
درصد پوکی نیام	Percent of pod null	-0.145	-0.709	0.127	0.556	1
تعداد نیام دوبذری	Number of 2seed pod	0.732	0.280	0.483	-0.247	0.458
روز تا نیام‌دهی کامل	Day to complete podding	-0.385	-0.831	-0.060	0.721	0.696**

* و **: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد

* & **: Significant at 0.05 and 0.01 levels, respectively.

ادامه جدول ۷- ضریب همبستگی ساده بین صفات زراعی مورد مطالعه در ارقام نخود در شرایط کنترل (اعمال آبیاری تکمیلی)
Continue the Table 7. Correlation coefficient between agronomy traits in *Cicer arietinum* cultivars under study in control condition

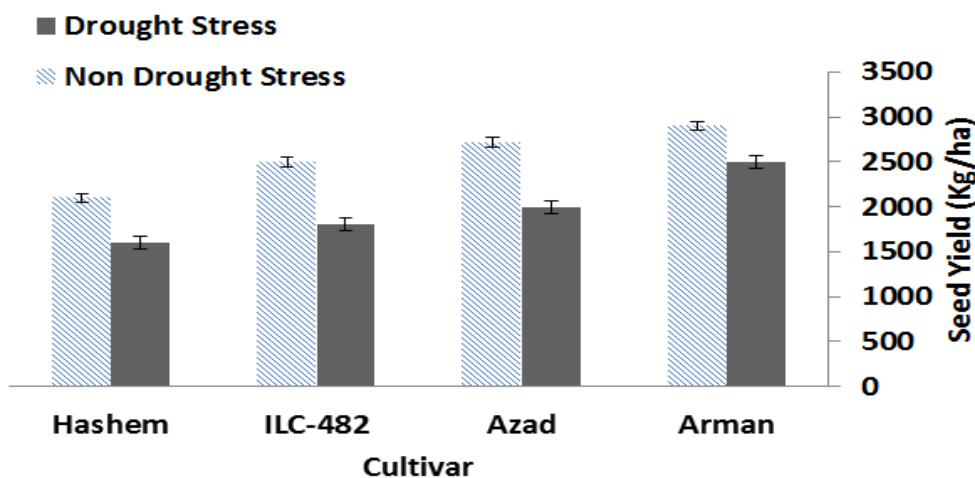
	Seed yield in supplementary irrigation condition	Number of sub branch	Number of pod in plant	Plant height	Number of plant.m ⁻²	Pod width
	عملکرد دانه در شرایط آبیاری تکمیلی	تعداد شاخه فرعی	تعداد نیام در گیاه	ارتفاع گیاه	تعداد گیاه در مترمربع	عرض نیام
عملکرد دانه در شرایط آبیاری تکمیلی	Seed yield in supplementary irrigation condition	1				
تعداد شاخه فرعی	Number of sub branch	-0.155	1			
تعداد نیام در گیاه	Number of pod in plant	0.675	0.789	1		
ارتفاع گیاه	Plant height	-0.846	0.378	-0.625	1	
تعداد گیاه در مترمربع	Number of plant	0.008	-0.127	0.345	0.428	1
عرض نیام	Pod width	-0.895	0.533	-0.830	0.951*	0.140
طول نیام	Pod length	-0.676	-0.154	-0.100	0.831	0.712
عرض کانوپی	Width canopy	-0.758	0.574	-0.948	0.539	-0.522
وزن ۱۰۰ دانه	100 Seed weight	0.994**	-0.056	0.615	-0.794	0.043
درصد پوکی نیام	Percent of pod null	0.487	0.757	-0.313	-0.310	-0.333
تعداد نیام دوبذری	Number of 2seed pod	0.352	0.897	-0.731	0.692	0.271
روز تا نیام‌دهی کامل	Day to complete podding	0.671	0.570	-0.093	-0.533	-0.368

* و **: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد

* & **: Significant at 0.05 and 0.01 levels, respectively.

حاصل از نمودار سه بعدی و تجزیه بای پلات می‌باشد (شکل ۵).

بیشترین عملکرد در شرایط تنش خشکی و شرایط آبیاری تکمیلی مربوط به رقم آرمان می‌باشد که مکمل نتایج



شکل ۵- عملکرد دانه در شرایط تنش خشکی و بدون تنش خشکی (آبیاری تکمیلی)

Fig. 5. Seed yield in drought and non-drought stress (supplementary irrigation) condition

هر دو شرایط محیطی، رقمی مناسب برای کشت در منطقه تحقیق می‌باشد. در خصوص نتیجه‌گیری کلی بخش پروتئینی قابل ذکر است که الگوی پروتئینی بذرهاى نخود بر اساس حضور و عدم حضور باندهای پروتئینی تنوع‌زنتیکی را مشخص نموده و قادر است شناساگرهای پروتئینی خاصی را معرفی کند که در شناسایی ارقام مختلف مورد استفاده می‌باشد. پیشنهاد در خصوص مطالعه حاضر این است که آزمایش در سال‌های زراعی آینده در منطقه مورد مطالعه به لحاظ تغییرات شرایط آب‌وهوایی مجدداً با ژنوتیپ‌های بیشتری مورد مطالعه و ارزیابی قرار گیرد و نیز جهت بررسی تفاوت بین ارقام از نظر مولکولی، علاوه بر نشانگر پروتئینی (SDS-PAGE) از نشانگرهای DNA هم استفاده گردد.

سپاسگزاری

از دانشگاه پیام‌نور و مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه به‌ویژه دکتر علی مصطفایی که به نحوی در انجام این گزارش همکاری نمودند، صمیمانه قدردانی می‌گردد.

به‌طور کلی پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر که منبع غذایی ارزشمندی برای انسان‌ها محسوب می‌شوند، در طول رویش بذر، تغییر ماهیت داده و منجر به تولید اسیدهای آمینه می‌شوند که منبع غذایی جنین در حال نمو است. پروفایل‌های پروتئین ذخیره‌ای بذر از جمله ابزارهای تعیین نزدیکی ژنتیکی در سطح مولکولی و حل مشکلات تاکسونومیکی و تبارشناختی است. از این اطلاعات تاکنون جهت تفکیک ارقام زراعی، حصول اطمینان از تشخیص صحیح گونه و تنوع‌زنتیکی گیاهان مختلف بهره گرفته شده است (Raesilelri *et al.*, 2015). از باندهای اختصاصی پروتئین‌های بذر احتمالاً بتوان برای شناسایی ژنوتیپ‌ها استفاده نمود. نتایج نشان داد که الکتروفورز (SDS-PAGE) پروتئین‌های بذر، می‌تواند به‌عنوان روشی ساده و اقتصادی جهت شناسایی تنوع ژنتیکی در ژرم‌پلاسما مورد استفاده قرار گیرد. به علت وجود تنوع ارقام در فضای بای‌پلات می‌توان عمل انتخاب را جهت برنامه‌های اصلاحی آتی از بین ارقام مورد مطالعه انجام داد. بر اساس سایر روش‌های آماری مولکولی و کمی در این مطالعه رقم آرمان با توجه به وجود بیشترین اختلاف با سایر ارقام (جدول تجزیه خوشه‌ای و جدول تشابه جاکارد) و بالابودن عملکرد در

منابع

- Ahmed, F., Gaur, P.M., and Slinkard, A.E. 1992. Isozyme polymorphism and phylogenetic interpretations in the genus *Cicer* L. as revealed by polyacrylamid gel electrophoresis of seed stronge protein. *Theoretical and Applied Genetics* 84: 688-692.
- Abd El-Zaher, M., and Mustafa, A. 2007. Genetic variation among Egyptian cultivars of *Vicia faba* L. *Pakistan Journal of Biological Science* 10(23): 4204-4210.
- Abolhassani, K.H., and Saeidi, G.H. 2006. Evaluation of drought tolerance of safflower lines based on tolerance and sensitivity indices to water stress. *Journal of Science and Technological Agricultural and Natural* 10: 407-418 (in Persian).
- Abozaryghazafroodi, A., Valizadeh, M., Honarneghad, R., and fotokeean, M.H. 2006. Comparison of clustering rice varieties the use SDS-PAGE Gel Electrophoresis Seed Proteins and Biometrical Traits data. *Journal of Sciences Agricultural* 36(5): 1251-1262.
- Beyranvand, A., Karimzadeh, G., and Sorooshzadeh, A. 2006. Study of a vernalization temperature on quantitative and electrophoretic changes of leaf soluble proteins in winter and spring canola (*Brassica napus*) cultivars. *Journal of Agricultural Science NatureResource* 12(5): 182-189.
- Blum, A. 1988. *Plant Breeding for Stress Environment*. CRC Press. Roca Raton, FL. pp: 38-78.
- Boslama, M., and Schapaugh, W.T. 1984. Stress tolerance in soybean. Part 1: evaluation of three screening techniques for heat and drought tolerance. *Crop Science* 24: 933-937.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Ehsanpor, A.A., Shojaie, B., and Rostami, F. 2009. The use of embryonic markers and seed storage proteins in identification of four pistachio cultivars. *Journal Taxonomy and Biosystematics* 2(3): 1-10. (In Persian).
- Elshazly, M.S., and Warboys, I.B. 1989. The use of transparent flexible tubes for studying the root extension and elongation of beans. *Journal of Experimental Agriculture* 25: 35-37.
- Razavizadeh, R., and Ehsanpour, A.A. 2013. Application of seed storage protein marker for identification of seven soybean (*Glycine max*) cultivars. *Journal of Cell & Tissue (JCT)* 3(4): 319-326.

12. Fareghi, S.H., Farshadfar, M., and Farshadfar, E. 2007. Study of chemical composition and nutrition value of preniiallucerne (*Medicago sativa* L.) and genetic diversity based on SDS-PAGE markes. Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research 15(3): 196-210. (In Persian).
13. Farshadfar, A., and Farshadfar, M. 2003. Evaluation of the genetic diversity of physiological and molecular markers RAPD chickpea lines in irrigated and rainfed conditions. Research and Builders 2(2): 69-63. (In Persian).
14. Fernandez, G.C.J. 1992. Effective selection criteria for assessing plant stress tolerance. In: C.C. Kuo (Ed.). Proceeding of an International Symposium on Adaptation of Food Crops to Temperature and Water Stress. AVRDC, Shanhua, Taiwan.
15. Fischer, R.A., and Maurer, R. 1978. Drought resistance in spring wheat cultivars. I. Grain yield responses. Australian Journal of Agricultural Research 29: 897-917.
16. Farshadfar, E., and Shutka, J. 2003. Multivariate analysis of drought tolerance in wheat substitution lines. Cereal Research Communications 31: 33-40.
17. Ganjeali, A., Bagheri, A.R., and Porsa, H. 2008. Germplasm evaluation chickpea (*Cicer arietinum* L.) for drought resistance. Iran Agricultural Research Magazine 7(1): 183-194. (In Persian).
18. Gupta, P.K., and Agrawal, G.G. 1977. Consumptive use of water by gram and linseed. India Journal Agriculture Science 47: 22-26.
19. Ghafoor, A., Ahmad, Z., Qureshi, A.S., and Bashir, M. 2002. Genetic relationship in *Vigna mungo* (L.) Hepper and *V. radiata*(L.) R. Wilczek based on morphological traits and SDS-PAGE. Euphytica 123: 367-378.
20. Gepts, P. 1989. Genetic diversity of seed storage proteins in plants. In: A.H.D. Brown, M.T. Clegg, A.L. Kahler, and B.S. Weir [Eds.]. Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources 64-82. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts.
21. Hameed, A., Mahmud Shah, T., Manzooratta, B., Iqbal, N., AhsanulHaq, M., and Ali, H. 2009. Comparative seed storage protein profiling of Kabuli chickpea genotypes. Pakistan Journal Biotechnology 41(2): 703-710.
22. Iqbal, S.M., Ghafoor, A., and Ayub, N. 2005. Relationship between SDS-PAGE Markers and *Ascochyta Blight* in chickpea. Pakistan Journal Biological Science 37(1): 87-96.
23. Iran's Agricultural Statistics. 2017. <http://amar.maj.ir/Portal/File/ShowFile.aspx>.
24. Jinghui, X.X., Wang, L., Shanyu, x., Zhou, L., Yue, J.F., and Dongyun, H. 2006. Polyethylene glycol fraction improved detection of low-abundant proteins by two-dimensional electrophoresis analysis of plant proteome. Phytochemistry 67: 2341-2348.
25. Kakaei, M., Zebarjadi, A.R., and Mostafaie, A. 2009. Comparison of genetic and morpho-physiological distance via SDS-PAGE marker in some Rapeseed genotypes. Journal of Agricultural Biotechnology 1(2): 1-15. (In Persian).
26. Kakaei, M., Zebarjadi, A.R., Mostafaie, A., and Rezaiezd, A. 2009. Determination of drought tolerant genotypes in *Brassica napus* L. based on drought tolerance indices. Journal of Electronic Plant Production 3(4): 107-124. (In Persian).
27. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.
28. Lawrence, G.J., Moos, H.J., Shepherd, K.W., and Wrigley, C.W. 1987. Dough quality of biotypes of eleven Australian wheat cultivars that differ in HMW glutenin subunits composition. Journal Cereal Science 6: 99-101.
29. Mohammadi, A., Ahmadi, J., and Habibi, D. 2005. Selection indices for drought tolerance in bread wheat (*Triticum aestivum*). Iranian Journal of Agronomy and Plant Breeding 1: 47-62. (In Persian).
30. Mukhlesur, R.M.D., and Hirata, Y. 2004. Genetic diversity in *Brassica* species using SDS-PAGE Analysis. Journal of Biological 4(2): 234-238.
31. Raesilelri, F., Keshavarzi, M., and Ghadam, P. 2015. Prosopis species of dark bean seed proteins investigated in Iran. Journal of Applied Biology, University of Al-Zahra 28 (1): 79-88. (In Persian).
32. Rosielle, A.A., and Hamblin, J. 1981. Theoretical aspects of selection for yield in stress and non-stress environments. Crop Science 21: 943-946.
33. Sadia, M., Malik, S.A., Rabbani, M.A., and Pearce, S.R. 2009. Electrophoresis characterization and the relationship between some *Brassica* species. Electronically of Journal Biology 5(1): 1-4.
34. SalehiShanjani, P., Jafari, A.A., Kolagari, M., and Esmaeili, M. 2013. Genetic diversity and geographic relationship between the 18 wild populations of *Agropyrondesertorum* by proteins. Plant Journal (Journal of Biology Iran) 27(2): 243-255. (In Persian).

-
35. Shobeiri, S., Ghassemi-Golezani, K., Golechin, A. and Saba, J. 2007. Effect of water limitation on growth and yield of three chickpea cultivars in Zanzan. *Journal of Agricultural Science and Natural Resources* 14: 32-43.
 36. Sneath P.H.A., and Sokal, R.R. 1973. *Numerical Taxonomy*. W.H: Freeman and CO, Sanfrancisco, U.S.A.
 37. Valizadeh, M., Shareati, F., Alyari, H., and Moharamneghad, S. 2011. Evaluation of relationship some of in main economical traits with storage protein in *Phaseolus vulgaris* L. *Iran Agricultural Research Magazine* 43(1): 163-173. (In Persian).

Study of relationship among seed proteins pattern with quantitative traits in some of chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars

Kakaei*, M.¹

Assistants Professor, Department of Agriculture (Plant Breeding and Genetics), Faculty of Sciences, Payame Noor University

Received: 15 July 2016

Accepted: 7 May 2017

DOI: 10.22067/ijpr.v10i1.57457

Introduction

Abiotic stress limits crop productivity, and plays a major role in determining the distribution of plant species across different types of environments. Chickpea (*Cicer arietinum* L.) is an important legume crop in Iran. Genetic diversity information is crucial for the choice of proper parents to establish new breeding programs. A number of molecular techniques have been developed to unveil the genetic potentials of plant materials. One of the most important methods for studying genetic diversity is using of Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) analysis of seed protein. SDS-PAGE seems to be a reliable molecular marker to investigate the genetic diversity of chickpea genotypes in IRAN. SDS-PAGE is practically a reliable method because seed storage proteins are largely independent of environmental fluctuation. The main objectives of present research was: (1) to investigate the power of SDS-PAGE markers for estimation of genetic diversity among some chickpea genotypes in west of Iran, (2) to investigate the genetic relationships between chickpea genotypes and (3) to determine and studying main drought indexes in chickpea genotypes could be selected main cultivars in drought and non-drought condition. This information will be useful to improve techniques for sampling chickpea genetic variation which might increase efficiency of conservation of germplasm.

Materials & Methods

Field experiment was carried out with four chickpea cultivars, based on randomized complete blocks design (RCBD) with three replications at the research farm of the Payame Noor University center of Asadabad in two different conditions (Drought conditions and supplementary irrigation) during 2010 cropping season. The cultivars were taken from Dryland Agricultural Research Institute, Sararood. In this study, seed protein profile of four chickpea cultivars include Arman, Hashem, Azad and ILC-482, were analyzed by Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE using 12/5% polyacrylamide). Protein extraction and gel electrophoresis was done By Laemmle (1970) Method. The seeds were powdered separately by liquid nitrogen. Cultivars seed protein were extracted by extraction buffer. At end of electrophoresis, protein bands were revealed by Coomassie Brilliant Blue R-250 staining. Biplot, 3D Plot, coefficient jaccard, cluster analysis and other analyses were done using the statistical software MSTAT-C, NTSYS and SPSS. The data for each cultivar was collected on a plot basis.

Results & Discussion

SDS-PAGE analysis showed significant differences between four cultivars chickpea at 17 and 25 kilo Dalton (kDa) bands. There are strong and weak proteins bands differences between cultivars. On the basis of SDS-PAGE results, 28.75 protein bands were observed with the Molecular Weight (MW) of 14 to 100 kDa. The presence of protein bands about 17 (kDa) in protein pattern of ILC-482, Hashem and Azad Cultivars and the absence of protein bands with approximate molecular weight 14 (kDa) in protein pattern of Arman cultivar can be used as protein markers for these chickpea cultivars. The specific proteins bands of seed may be used as markers for identification of the genotypes. Correlation between agronomic and molecular traits was assessed using Mantel test and significant positive correlation was observed between them. The results of drought stress indices and Biplot analysis suggested Arman genotype was the most tolerant. Biplot analysis also showed HAM and YI selection indices were the best to identify drought tolerant genotypes.

*Corresponding Author: P.O.Box: 19395-4697, mehdikakaei37@gmail.com

Conclusion

In most cases, an intermediate level of polymorphism have been reported with SDS-PAGE markers, and this study showed a considerable amount of polymorphism. We recommend further studies to be conducted by using number of chickpea genotypes as well as bigger and DNA molecular markers. Results of this study can be used in germplasm management practices, developing plant geneticist and breeders for planning future explorations, and crop improvement purposes.

Keywords: Biplot, Jaccard coefficient, Mantel test, Protein Marker, Supplementary irrigation