Archive of SID

زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال هشتم، شماره بیست و هشتم، تابستان ۱۳۹۵، صفحه ۷۹-۱۰۷
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۰۸/۱۰
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۵/۰۱/۲۲
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۵/۰۴/۱۹

بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مریم‌گلی دارویی (*Salvia officinalis*) با استفاده از الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر

سیدعباس میرجلیلی *
مؤسسه آموزش عالی علمی کاربردی جهاد کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

چکیده

سرده سلوی از تیره نعناییان، بیش از ۹۰۰ گونه را شامل می‌شود که پراکندگی نسبتاً وسیعی در فلور گیاهی ایران دارد. تاکنون، حدود ۵۸ گونه از این سرده در کشور شناسایی و گزارش شده که بالغ بر ۱۷ گونه آن انحصاری ایران است. به منظور بررسی، شناسایی و مقایسه جمعیت‌های مختلف گونه مریم‌گلی دارویی، تنوع درون گونه ای و شباهت ها و دوری جمعیت‌های روییده در ایران، آزمایشی با استفاده از ژل الکتروفورز یک بعدی با روش SDS-PAGE انجام گرفت. بذرهای پنج جمعیت جمع‌آوری شده مریم گلی دارویی از بانک ژن تهیه و بررسی شد. پروتئین بذرهای با استفاده از بافر استخراج و اندازه گیری شد. روابط فیلوژنتیک با استفاده از شمارش نوارها و مقایسه آنها انجام گردید. شاخص شباهت جمعیت ها محاسبه و دندروگرام مربوط ترسیم شد. مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون توکی انجام شد. نتایج نشان داد که جمعیت‌های مورد مطالعه، اختلاف معنی‌داری (در سطح ۱ درصد) از نظر میزان پروتئین با یکدیگر دارند. ۳۹ نوار پروتئینی روی ژل شمارش شد. بیشترین تعداد در جمعیت شماره ۲ مشاهده شد و جمعیت های شماره ۱ و ۵ کمترین تنوع پروتئین را داشتند. دندروگرام مربوطه، پنج جمعیت مورد بررسی را به دو گروه کلی شامل جمعیت شماره ۱ و گروه دیگر چهار جمعیت مابقی دسته‌بندی کرد. چهار جمعیت دیگر، خود به دو زیرگروه شامل جمعیت‌های شماره ۲ و ۳ در یک زیرگروه و جمعیت‌های شماره ۴ و ۵ در زیرگروه دیگر دسته‌بندی شدند.

واژه‌های کلیدی: الکتروفورز، ایران، فیلوژنی، مریم‌گلی

مقدمه

مطالعه پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر به دلیل ثابت بودن در نوع و میزان، اطلاعات مهمی در مورد روابط خویشاوندی در گیاهان ارایه می‌کند. این در حالی است که پروتئین‌های موجود در بافت‌های رویشی گیاه تحت شرایط محیطی و تنش‌ها قرار می‌گیرند (Amini and Ehsanpoor, 2009). بنابراین، تحلیل پروتئین‌های ذخیره ای بذر می‌تواند ابزاری برای شناسایی ارقام و

* نگارنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: a.mirjalili@itvhe.ac.ir، شماره تماس: ۰۳۱۳۷۷۵۷۲۰۱

Copyright©2016, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

www.SID.ir

Archive of SID

گونه‌های گیاهی باشد (Razavizadeh and Rostami, 2013). مطالعه پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر در تشخیص و توصیف تنوع ارقام و جمعیت‌های گیاهی بسیار سودمند است و اطلاعات مفیدی را در روابط فیلوژنتیک جمعیت‌های یک تاکسون فراهم می‌کند (Nisar *et al*., 2007). به دلیل ثابت‌تر بودن نوع و میزان پروتئین های ذخیره‌ای بذر در بذرهای بالغ (Magni *et al*., 2007) نسبت به سایر بافت‌های گیاهی، بررسی آنها می‌تواند ابزاری برای شناسایی ارقام و گونه های گیاهی باشد (Kakaei and Kahrizi, 2011). الکتروفورز پروتئین، ابزاری نیرومند برای تشخیص تنوع ژنتیکی است و SDS-PAGE به‌ویژه تکنولوژی قابل اعتمادی به شمار می‌رود، زیرا پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر به‌میزان زیادی از نوسانات محیطی مستقل هستند (Sinha *et al*., 2012). این روش برای بررسی روابط بین سرده‌ای (Masoumi *et al*., 2012)، بین گونه‌ای (Mirjalili and Mirzaei, 2005؛ Emre *et al*., 2007؛ Jafari *et al*., 2009؛ Sinha *et al*., 2012) و مطالعه ارقام و ژنوتیپ‌ها (Haque *et al*., 2015) و جمعیت‌ها (Farkas *et al*., 2008؛ Seyedi *et al*., 2010؛ Musibau *et al*., 2013) گزارش شده است.

پژوهش‌های اخیر بیانگر این است که گیاهان دارویی حاوی مقادیر متفاوتی از پروتئین هستند که تأثیر قابل ملاحظه‌ای بر خواص درمانی گیاه می‌گذارند. یکی از این گیاهان دارویی، مریم‌گلی است که دارای بیشترین میزان پروتئین و آمینو اسید نسبت به دانه‌هایی است که به طور سنتی مصرف می‌شوند. گیاه مریم‌گلی حاوی حدود ۱۹ تا ۲۳ درصد پروتئین است. پروتئین بذر مریم‌گلی دارای تعادل در آمینو اسید ضروری است. با این دلایل، دانه گیاه مریم گلی در حال حاضر یک گزینه در درمان یا مدیریت دیابت یا مدیریت شرایط و عوامل خطر مربوط به دیابت، فشارخون و عوامل التهابی است (Monroy-Torres *et al*., 2008). در پژوهش حاضر، به بررسی میزان پروتئین موجود در گونه های مختلف و مقایسه جمعیت‌ها به لحاظ روابط درون‌گونه‌ای در مریم‌گلی پرداخته شده است.

سرده سلوی (*Salvia*) از تیره نعناییان (Lamiaceae) شامل ۷۰۰ تا ۹۰۰ گونه در سرتاسر دنیای قدیم و جدید است. درجه بومی بودن سلوی در ایران ۲۹ درصد است. این سرده همچنین پراکندگی نسبتاً وسیعی در فلور گیاهی کشور دارد، به طوری که تاکنون حدود ۵۸ گونه سلوی در ایران شناسایی و گزارش شده است که از میان این تعداد، بالغ بر ۱۷ گونه آنها بومزاد هستند (Mozaffarian, 1996؛ Sepehry Javan *et al*., 2012؛ Golparvar and Hadipanah, 2013). مریم‌گلی دارویی (*Salvia officinalis* L.) یکی از معروف‌ترین گونه های دارویی این سرده است. خاستگاه این گونه نواحی مدیترانه است، اما امروزه به واسطه خواص دارویی، معطر و تغذیه‌ای آن، در اغلب مناطق معتدله در سراسر دنیا کشت می‌شود (Echeverrigaray and Agostini, 2006). بررسی تنوع ژنتیکی در میان جمعیت‌ها و گونه‌های سلوی به وسیله توالی‌های nrDNA ITS (Zhang *et al*., 2012)، روش RAPD (Cahill, 2004؛ Echeverrigaray and Agostini, 2006؛ Farkas *et al*., 2008) تاکسونومی عددی (Reales *et al*., 2004) و همچنین ریخت‌شناسی (Kharrazian, 2009) انجام گرفته است.

هدف از انجام پژوهش حاضر، بررسی، شناسایی و

www.SID.ir

Archive of SID

مقایسه جمعیت‌های مختلف گونه مریم‌گلی دارویی، تنوع درون‌گونه‌ای و شباهت‌ها و دوری جمعیت‌های روییده در ایران (ثبت شده در بانک ژن گیاهی) با استفاده از ژل الکتروفورز یک بعدی با روش SDS-PAGE به عنوان روشی ساده، سریع، ارزان و رایج برای مطالعه و مقایسه تفاوت الگوی پروتئینی جمعیت‌های مختلف گونه مریم گلی دارویی و تنوع ژنتیکی این جمعیت‌ها بود، که به عنوان ژرم‌پلاسم در بانک ژن گیاهی ایران نگهداری می‌شود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: بذر رسیده و تازه از پنج جمعیت جمع‌آوری شده مریم گلی دارویی از نقاط مختلف کشور که در بانک ژن گیاهی ایران (مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور) نگهداری می‌شود، به میزان ۲۰ تا ۵۰ گرم تهیه شد (جدول ۱).

استخراج پروتئین و انجام الکتروفورز: پروتئین بذرها پس از جداسازی پوسته‌ها، با استفاده از بافر استخراج حاوی ۱۰۰ میلی‌مولار بافر تریس فسفات (اسیدیته=۶/۸) و ۰/۵ میلی‌مولار EDTA (اسیدیته=۸) و مرکاپتواتانول استخراج شد. محتوای پروتئین دانه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Mini-1240، شرکت Shimadzu، ژاپن) در طول موج ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری و محاسبه شد.

عصاره خام حاوی پروتئین، به مدت ۵ دقیقه در بافر کلریدریک اسید تریس نیم مولار با اسیدیته برابر با ۶/۸ و مرکاپتواتانول ۱۰ درصد و گلیسرول ۳ درصد جوشانیده شد (Sanches-Yelamo *et al.*, 1995؛ Sammour, 1999). پروتئین‌ها با روش SDS-PAGE با دستگاه الکتروفورز (مدل Power-Pac Basic، شرکت Bio-RAD، امریکا) بارگیری شد.

اجزای ژل پایین (آکریلامید ۱۲ درصد، بیس آکریلامید ۰/۲ درصد، تریس ۰/۳۷۵ با اسیدیته برابر با ۸/۸) تهیه شد. برای پلیمریزه شدن ژل از TEMED استفاده شد که در آخرین مرحله به سایر مواد تشکیل‌دهنده ژل افزوده شد، و بلافاصله این مواد به آرامی مخلوط و در فضای بین شیشه‌های دستگاه الکتروفورز و تا ارتفاع مناسب ریخته شد. به منظور جلوگیری از رسیدن هوا به ژل پایین از ۵ میلی‌لیتر متانول خالص استفاده شد و پس از ۳۰ دقیقه که در دمای اتاق پلیمریزه شد، سطح فوقانی ژل با آب مقطر شسته و تا حد امکان از وجود مایعات خالی شد و مواد تشکیل‌دهنده ژل بالا (آکریلامید ۴ درصد، تریس ۰/۱۲۵ با اسیدیته برابر با ۶/۸) با غلظت ۵ درصد آکریلامید تهیه و در بالای ژل اولیه ریخته شد و شانه نیز به آرامی در ژل قرار داده شد. پس از ۳۰ دقیقه شانه‌ها به آرامی از ژل خارج و چاهک‌ها با آب مقطر شسته شدند. تانک الکتروفورز با بافر تریس-گلیسین (شامل ۱۵ گرم تریس با اسیدیته برابر با ۸/۶، ۹۴ گرم گلیسین، ۵۰ میلی‌لیتر SDS ۱۰ درصد که تا حجم یک لیتر آب دوبار تقطیر تهیه شده بود) پُر شد و نمونه‌ها پس از تزریق در چاهک‌ها به میزان ۲۰ میکرولیتر (حاوی ۴۳ میکروگرم پروتئین)، بلافاصله با ولتاژ ثابت ۱۸۰ ولت به مدت ۳ ساعت الکتروفورز شد.

برای رنگ‌آمیزی با کوماسی‌بلو ابتدا ژل از دستگاه الکتروفورز خارج شد، سپس ۲۰۰ میلی‌لیتر محلول رنگ‌آمیزی (شامل ۰/۲۵ گرم کوماسی بلو R-250، ۵۰ میلی‌لیتر استیک اسید، ۲۰۰ میلی‌لیتر متانول و آب دوبار

www.SID.ir

Archive of SID

تقطیر تا حجم نیم لیتر) روی آن ریخته شد. ظرف رنگ به مدت یک ساعت با ۵۰ دور در دقیقه حرکت داده شد. پس از آن ژل رنگ‌آمیزی شده به مدت چند ثانیه با آب مقطر معمولی شسته شد. برای مشاهده باندهای پروتئینی از محلول رنگ‌بر (شامل ۴۵ میلی‌لیتر متانول، ۱۰ میلی‌لیتر استیک اسید و آب دوبار تقطیر تا حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر) استفاده شد. پس از شفاف شدن زمینه ژل و ظهور باندهای پروتئینی رنگ‌بری متوقف شد و ژل به آب مقطر منتقل و سپس عکس‌برداری شد.

روابط فیلوژنتیک: با عکس‌برداری از ژل الکتروفورز به دست آمده، شمارش نوارها و مقایسه آنها انجام شد. هر نوار معرف یک نوع پروتئین در آن جمعیت است. با توجه به این که جمعیت‌های یک گونه بررسی می‌شود، اختلافات بسیار جزیی است، بنابراین سعی شد نوارهای باریک نیز با دقت و با روش بزرگ‌نمایی، شمارش شوند. در مجموع، ۳۹ نوار شمارش شد. داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ تحلیل شد.

شاخص شباهت جمعیت‌ها از رابطه ۱ محاسبه و ماتریس تشابه تنظیم شد.

رابطه ۱: شاخص تشابه = تعداد نوارهای مشترک بین دو جمعیت / مجموع نوارهای دو جمعیت

تحلیل داده‌ها: تحلیل میزان پروتئین موجود در بذر جمعیت های مختلف به صورت طرح تک عاملی متعادل به صورت Stack در نرم‌افزار Minitab نسخه ۱۴ با تجزیه واریانس یک طرفه صورت گرفت. مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی انجام شد. تحلیل خوشه‌ای بر مبنای داده‌های حضور و غیاب پروتئین ها انجام شد. هر باند پروتئینی به عنوان یک صفت کیفی در نظر گرفته شد و حضور آن با عدد یک و غیاب آن عدد صفر در نظر گرفته شد (Carreras *et al.*, 1997). تحلیل خوشه‌ای نوارها و رسم دندروگرام با استفاده از ضریب Jaccard's بر مبنای روش UPGMA توسط نرم‌افزار NTSYS-PC (Rohlf, 1992) انجام شد.

جدول ۱- مشخصات بذری جمعیت‌های مورد مطالعه مریم‌گلی در ایران

شماره جمعیت	نام جمعیت	خاستگاه	شماره ثبت بانک ژن
۱	جمعیت نجف‌آباد	نجف‌آباد اصفهان	۲۸۳۰۶
۲	جمعیت اصفهان	اصفهان	۲۳۸۹۱
۳	جمعیت تهران	تهران	۲۳۸۷
۴	جمعیت خلخال	خلخال	۱۱۲۵
۵	جمعیت کرج	کرج	۹۱۹

نتایج

میزان پروتئین: مقایسه میانگین پروتئین در جمعیت شماره ۱ (نجف‌آباد) با سایر جمعیت‌ها نشان داد که میانگین تمام جمعیت‌ها با جمعیت شماره ۱ (نجف‌آباد) برابر بود. یعنی اختلاف معنی‌داری بین جمعیت‌ها وجود نداشت و جمعیت‌ها مشابه بودند.

مقایسه میانگین پروتئین در جمعیت شماره ۲ (اصفهان) با جمعیت‌های شماره ۳ (تهران)و ۴ (خلخال) و ۵ (کرج) نشان داد که میانگین جمعیت‌های شماره ۳ (تهران) و ۴ (خلخال) با جمعیت شماره ۲ (اصفهان)

www.SID.ir

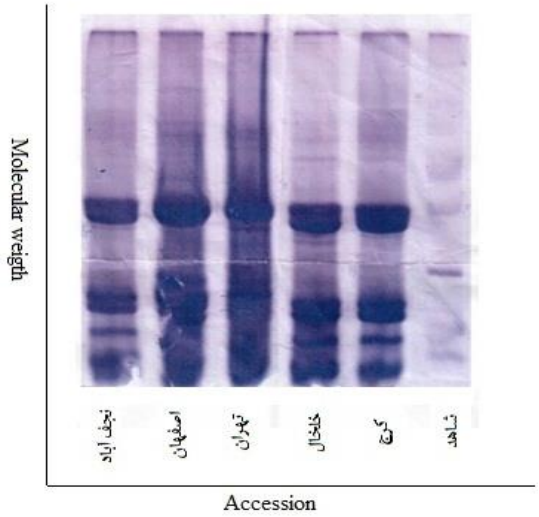
Archive of SID

برابر است، اما بین جمعیت شماره ۲ (اصفهان) و ۵ (کرج) اختلاف معنی‌داری وجود دارد.

مقایسه میانگین میزان پروتئین بین جمعیت شماره ۳ (تهران) و جمعیت‌های شماره ۴ (خلخال) و ۵ (کرج) نشان داد که میانگین جمعیت‌های شماره ۴ (خلخال) و ۵ (کرج) با جمعیت شماره ۳ (تهران) برابر است و بین این جمعیت‌ها اختلاف معنی‌داری وجود ندارد.

نتایج نشان داد که میانگین میزان پروتئین در جمعیت شماره ۴ (خلخال) با جمعیت شماره ۵ (کرج) برابر است و بین این جمعیت ها اختلاف معنی‌داری وجود ندارد.

در مجموع، نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی به لحاظ میزان پروتئین در بذرهای جمعیت‌های مورد مطالعه نشان داد که برخی از آنها از نظر میزان پروتئین با یکدیگر برابر نیستند، به نحوی که تنها دو جمعیت اصفهان و کرج از نظر میزان پروتئین اختلاف معنی‌داری با یکدیگر دارند و اختلاف میزان پروتئین جمعیت‌های دیگر معنی‌دار نیست، در نتیجه این جمعیت‌ها از نظر میزان پروتئین با یکدیگر یکسان هستند (جدول‌های ۲ و ۳).



شکل ۱- نوارهای پروتئینی حاصل از الکتروفورز جمعیت‌های مریم‌گلی

جدول ۲- تجزیه و تحلیل واریانس جمعیت‌های مریم‌گلی مورد مطالعه بر اساس میزان پروتئین دانه‌ها. **: اختلاف معنی‌دار در سطح یک‌درصد.

منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
پروتئین بذر	۴	۰/۹۰۲**
خطا	۲۴۰	۰/۲۳۱
مجموع	۲۴۴	

جدول ۳- میانگین و انحراف معیار و درصد تشابه جمعیت‌های مورد مطالعه بر اساس میزان پروتئین دانه‌ها

Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev

Level	N	Mean	StDev	+---------+---------+---------+---------
1	49	0.3061	0.4657	(--------*--------)
2	49	0.5714	0.5000	(--------*--------)
3	49	0.5306	0.5042	(--------*--------)
4	49	0.3265	0.4738	(--------*--------)
5	49	0.2857	0.4564	(--------*--------)
				+---------+---------+---------+---------
				0.15 0.30 0.45 0.60

Pooled StDev = 0.4804

الگوی پروتئینی: بررسی نوارهای ایجاد شده نشان داد که یک گروه نوار در ردیف‌های ۲۲، ۲۴، ۲۵، ۲۶، ۲۷ و ۲۸ در همه جمعیت ها مشترک است و با توجه به این که تعداد پنج نوار به شماره‌های ۲۴ تا ۲۸ در مجاورت یکدیگر قرار دارند، نوار ضخیمی (major band) را به نمایش گذاردند (شکل ۱). نوار ردیف ۱۲،

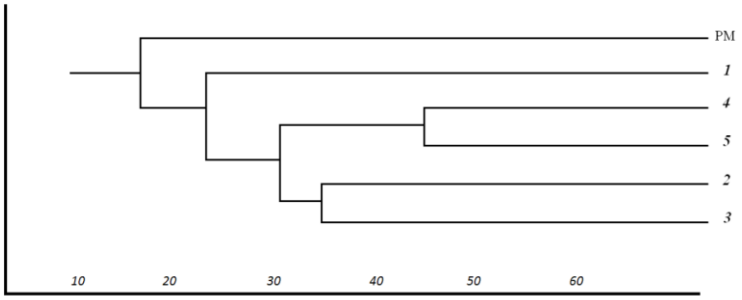
www.SID.ir

Archive of SID

پـروتئین اختصاصـی جمعیـت شـماره ۱ (جمعیـت نجف آباد) و نوار ردیف ۳۳ اختصاصی جمعیت شماره ۴ اسـت. نوارهـای ۴، ۱۴، ۱۶، ۱۸ و ۱۹ پـروتئین‌هـای اختصاصـی جمعیـت شـماره ۳ و نوارهـای ۳۱، ۳۲، ۳۴، ۳۵، ۳۶، ۳۷، ۳۸ و ۳۹ اختصاصـی جمعیـت شـماره ۲ هستند. کلیه نوارهای ۱، ۲، ۹ و ۲۹ در تمـام جمعیـت‌هـا به غیر از جمعیت شماره ۱ (جمعیت نجف‌آباد) مشترک هستند و این جمعیت، پروتئین‌های مذکور را ندارد. نوار شـماره ۱۷ در جمعیـت شـماره ۵ نـوار ردیـف ۶ در جمعیـت شـماره ۳ یافـت نشـد. از نظـر تعـداد نوارهـا، بیشترین تعداد در جمعیت شـماره ۲ بـا ۲۸ نـوار، سـپس جمعیت شماره ۳ با ۲۶ نـوار و جمعیـت شـماره ۴ بـا ۱۶ نوار و جمعیـت‌هـای ۱ شـماره و ۵ هرکـدام بـا ۱۴ نـوار کمترین تنوع پروتئینی را دارا هستند.

جدول ۴- ماتریس درصد شباهت پروتئینی جمعیت‌های مورد مطالعه مریم‌گلی دارویی

شماره جمعیت	۱	۲	۳	۴	۵
۱	۱				
۲	۲۳/۸	۱			
۳	۲۲/۵	۳۳/۳	۱		
۴	۳۰	۲۹/۵	۳۰/۹	۱	
۵	۲۸/۵	۳۰	۳۰	۴۶/۶	۱



شکل ۲- دندروگرام حاصل از شباهت جمعیت‌های مورد بررسی مریم‌گلی دارویی

بحث و نتیجه‌گیری

پـروتئین‌هـای ذخیـره‌ای بـذر تحـت تـأثیر شـرایط محیطی قرار نمی‌گیرند و بسیار پایـدار هسـتند. بنـابراین، الگوهای نواربندی الکتروفورزی کل پروتئین‌های بذر و اجـزای پـروتئین‌هـای ذخیـره‌ای بـذر (آلبـومین‌هـا، گلوبولین‌ها، پرولامین‌هـا و گلـوتلین‌هـا) چنانچـه بـا ژل الکتروفورز سـدیم دو دسـیل سـولفات پلـی آکریلامیـد (SDS-PAGE) آشکار شوند، شواهد ارزشمندی بـرای درک مسایل تاکسونومیک و تکـاملی فـراهم مـی‌کننـد (Freitas *et al.*, 2004؛ Kamel *et al.*, 2003؛ Fukuda *et al.*, 2005 ،Ribeiro *et al.*, 2004).

بر اسـاس نتـایج بـه دسـت آمـده از ژل الکتروفـورز پروتئین هـای بـذری جمعیـت هـای مـریم‌گلـی، الگـوی پروتئینی ذخیره‌ای بذرها، تنوع جمعیت‌هـا را نشـان داد.

www.SID.ir

Archive of SID

تحلیل خوشه‌بندی نیز داده‌هایی را فراهم می‌کند که بررسی روابط فیلوژنتیک بین گونه‌ها و جمعیت‌ها را امکان‌پذیر می‌سازد.

با نگاه کلی به ژل به دست آمده، چهار نقطه کلی برای تجمع نوارها دیده می‌شود که سه تای آنها با تراکم زیاد و یکی با تراکم نسبتاً کمتر دیده می‌شود. از میان نوارهای پهن، دو دسته در گروه پروتئین‌های سنگین وزن و یکی در دسته میان وزن‌ها (به علت قرارگرفتن در میانه مسیر حرکت) قرار دارند. این گروه‌بندی و آرایش نوارها، به دلیل شباهت زیاد تاکسون‌ها، بیشتر در تاکسون‌های فروگونه‌ای و ارقام مشاهده می‌شود، نتیجه‌ای که Javaid و همکاران (۲۰۰۴) نیز در بررسی خود روی ارقام مختلف بادام‌زمینی، به الگوی پروتئینی با پنج نوار پهن دست یافتند. همچنین، با توجه به وجود مولکول‌هایی با وزن‌های متفاوت، دسته‌بندی گروه‌های پروتئینی بر اساس مطالعه Miskoska-Milevska و همکاران (۲۰۰۸) و گزارش‌های آنها روی زیرگونه‌های ارقام گوجه‌فرنگی است.

مطابق نتایج به دست آمده از کار Haque و همکاران (۲۰۱۵)، طیف گسترده‌ای از پپتیدهای پروتئینی (با وزن‌های مختلف از سبک وزن تا سنگین وزن) را تصویر کرد که توان بالقوه برای متمایز کردن جمعیت های برنج را نشان داد و چنین استنتاج کرد که این امر می‌تواند تنوع جدیدی را برای خلق گوناگونی در میان ژرم‌پلاسم‌های موجود فراهم کند.

با توجه به نتایج به دست آمده و به استناد آنها و شباهت اندک (کمتر از ۵۰ درصد) در میان جمعیت‌های *S. officinalis* مشخص شد که تنوع ژنتیکی در بین جمعیت‌ها نسبتاً زیاد است و این موضوع دستیابی به فنون اصلاح نژادی و استفاده از ژرم‌پلاسم این گیاه را به عنوان استخر ژنی در مطالعات اصلاح‌نژادی مقدور می‌سازد.

در ضمن، Farkas و همکاران (۲۰۰۸) در مطالعه چهار جمعیت از گونه *S. officinalis* جمع‌آوری شده از کشورهای مختلف اروپایی با استفاده از روش RAPD، تنوع ژنتیکی جالبی که نشان‌دهنده عدم ارتباط جغرافیایی جمعیت ها بود، نشان دادند. همچنین درصد عدم تشابه بین این جمعیت ها قابل توجه بود؛ به نحوی که دو جمعیت جمع‌آوری شده از یونان و رومانی ۷۷ درصد عدم تشابه با نمونه‌های مجارستانی داشتند. این عدم تشابه، برای جمعیت های مجارستانی که بیشترین شباهت را داشتند، به ۶۱ درصد بالغ می‌شد. از نظر جغرافیایی، رومانی و مجارستان دو کشور همجوار هستند و به نظر می‌رسد که بذرهای جمع آوری شده از این دو کشور تشابه بیشتری داشته باشند و بذرهای یونانی به دلیل داشتن فاصله با دو کشور مذکور، از عدم تشابه بیشتری با جمعیت‌های کشورهای مجارستان و رومانی داشته باشند. لذا، رابطه منطقی بین جمعیت‌ها و جغرافیای طبیعی آنها وجود نداشت. این در حالی است که در پژوهش حاضر نیز هیچ الگوی جغرافیایی برای تنوع جمیعت‌های *S. officinalis* یافت نشد. اگر چه مواد ژنتیکی استفاده شده در این مطالعه، از مناطق مختلف جغرافیایی جمع آوری شده بودند (شکل ۲، جدول ۴).

Jafari و همکاران (۲۰۰۹) در مطالعه ژل الکتروفورز پروتئین‌های بذر جمعیت‌های چهار گونه متفاوت از سرده سلوی، ۲۲ نوار پروتئینی را شمارش

www.SID.ir

Archive of SID

کردند. در پژوهش حاضر، ۳۹ نوار پروتئینی شمارش شد. Echeverrigaray و Agostini (۲۰۰۶) در مطالعه ده جمعیت برزیلی از گونه مریم‌گلی دارویی (*S. officinalis*) و با استفاده از ۱۸ پرایمر، ۱۹۵ باند بر اساس روش RAPD با اندازه مولکولی ۱۰۰ تا ۲۵۰۰ جفت باز شناسایی کردند. که ۵۹/۵ درصد آنها چندشکلی بودند، اما اطلاعاتی که ناشی از نوارهای پروتئینی بر مبنای ژل الکتروفورز باشد، برای مقایسه با مطالعه کنونی یافت نشد.

بررسی ژنوتیپ‌های برنج نشان داد که تنوع ژنتیکی اندکی (دوری حداکثر ۲۹ درصدی) که در برخی ژنوتیپ‌ها شباهت به ۱۰۰ درصد می‌رسد، بین آنها وجود دارد و مؤلفان آن را نتیجه زمینه ژنتیکی نزدیک آنها تفسیر کرده‌اند (Haque *et al*., 2015). در تحقیق حاضر، تنوع ژنتیکی زیادی دیده شد (جدول ۴). در هر حال، بررسی الکتروفورزی پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر، ارتباط مستقیمی با زمینه ژنتیکی پروتئین‌هایی دارد که می‌تواند به عنوان نشانگر بالقوه برای مطالعه تنوع ژنتیکی و شناخت گوناگونی مورد استفاده قرار گیرند (Iqbal *et al*., 2005؛ Javaid *et al*., 2004).

میزان پروتئین در بذر گیاهان مختلف بررسی شده است. بررسی میزان پروتئین در بذر گونه‌های مختلف یک سرده، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در میزان پروتئین آنها است. برای نمونه، Emre و همکاران (۲۰۰۷) با مطالعه پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر گونه‌های مختلف سرده خلر (*Lathyrus*) از نواحی مختلف جغرافیایی، نشان دادند که تفاوت معنی‌داری در مقدار پروتئین گونه‌ها وجود دارد. اما، مطالعات صورت گرفته روی ارقام مختلف یک گونه نشان داده است که معمولاً تفاوت معنی‌داری بین میزان پروتئین در آنها وجود ندارد. بررسی محتوای پروتئین محلول در بذر کلزا نشان داد که در ارقام منتخب، تفاوت معنی داری با یکدیگر نداشتند (Razavizadeh and Rostami, 2013). نتایج به دست آمده از محتوای پروتئین کل در چهار رقم پسته ایرانی نیز که توسط Ehsanpour و همکاران (۲۰۱۰) به دست آمد حاکی از عدم اختلاف بین میزان پروتئین در ارقام مختلف یک گونه است. این در حالی است که در تحقیق حاضر، میزان پروتئین در جمعیت‌های مختلف یک گونه تفاوت معنی‌داری داشت (جدول ۲).

در نگاه اول چنین استنباط می‌شود که بذرهای جمع‌آوری شده از مکان‌های نزدیک به هم، باید شباهت بیشتری داشته باشند، اما دندروگرام حاصل نشان داد که نزدیکی جغرافیایی در این جمعیت‌ها کمترین تأثیر را داشت و به نظر می‌رسد که هر کدام از جمعیت ها از خاستگاه متفاوتی منشأ گرفته‌اند. شکل ۲ نشان داد که جمعیت‌های تهران و اصفهان بیشترین شباهت و پس از آن جمعیت‌های کرج و خلخال شباهت‌های بیشتری با هم دارند و جمعیت نجف آباد که کمترین فاصله جغرافیایی را با اصفهان دارد، کمترین شباهت بین جمعیت ها را داشت. به طوری که در مجموع، پنج جمعیت بررسی شده به دو گروه کلی شامل یک جمعیت نجف‌آباد و گروه دیگر چهار جمعیت مابقی تقسیم شد. چهار جمعیت نیز خود به دو زیرگروه شامل جمعیت‌های تهران و اصفهان در یک زیرگروه و جمعیت های کرج و خلخال در زیرگروه دیگر دسته‌بندی شدند (شکل ۲). Echeverrigaray و Agostini (۲۰۰۶) نشان دادند که جمعیت‌های

www.SID.ir

Archive of SID

مریم گلی موجود در کشور برزیل که تصور می‌شود همگی توسط مهاجران اروپایی به آن کشور وارد شده باشند، از خاستگاه‌های متفاوتی بودند.

بر اساس نظر Cahill (۲۰۰۴) سه عامل غالب در تنوع ژنتیکی مریم‌گلی عبارت است از: گونه، طیف جغرافیایی و انتخاب انسان. وی در بررسی تنوع ژنتیکی ۳۸ جمعیت خودرو و اهلی شده گونه *Salvia hispanica*، با استفاده از روش RAPD نشان داد که تنوع ژنتیکی در بین جمعیت‌های خودرو بیشتر از جمعیت های اهلی شده است و چنین نتیجه‌گیری کرد که از دست رفتن تنوع، اهلی شدن و احتمال فقدان تنوع در واریته‌های تجاری جدید، وجود دارد. وی بر اساس نتایج خود، مرکز تنوع ژنتیکی منطقه مورد نظر را پیش‌بینی کرد. در تحقیق حاضر، با توجه به عدم آگاهی از مجموع جمعیت‌های موجود در کشور، به بررسی جمعیت های موجود در بانک ژن گیاهی پرداخته شد. بنابراین، بررسی تنوع کلی در سراسر کشور، نیازمند اطلاعات جامع‌تر و اطمینان کامل از جمع‌آوری و مقایسه کل جمعیت‌های مریم‌گلی برای اظهار نظر است. دوم این که، شباهت جمعیت های حاضر بدون وجود رابطه‌ای بین مسافت جغرافیایی است و به نظر می‌رسد از خاستگاه‌های متفاوتی منشأ گرفته باشند. در همین رابطه، Sepehry Javan و همکاران (۲۰۱۲)، با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR، هشت گونه از سرده مریم‌گلی را که در منطقه اردبیل جمع‌آوری کرده بودند، از نظر تنوع ژنتیکی بررسی نمودند. آنها سطح دوری ژنتیکی بالایی را در بین گونه‌های این سرده نشان دادند و این دو نشانگر را ابزارهای کارآمدی برای ارزیابی روابط ژنتیکی در سرده مریم‌گلی معرفی کردند.

بالا بودن تعداد نوارها در یک جمعیت نشان‌دهنده روشن بودن ژنوم‌های بیشتر در این جمعیت ها است. یکی از دلایل این امر می‌تواند حاکم بودن شرایط محیطی ویژه برای سنتز پروتئین‌های مربوطه مثلاً تنش‌های محیطی باشد.

قطعاً اندازه‌گیری وزن مولکولی و تعیین نشانگرهای وزنی و استفاده از ژل دو بعدی برای مشخص کردن دقیق‌تر تنوع ژنتیکی و وزن پپتیدهای آشکار شده، بسیار بهتر و تعیین‌کننده‌تر است. لذا، می‌تواند در مطالعات آتی این جمعیت‌ها مد نظر قرار گیرد.

سپاسگزاری

نگارنده از همکاری بانک ژن مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور به خاطر در اختیار گذاشتن بذر مورد مطالعه در این تحقیق تشکر و قدردانی می‌کند.

منابع

Amini, F. and Ehsanpour, A. A. (2009) Study of protein changes in tomato (*Lycopersicon esculentum*) under salt stress using two dimensional electrophoresis. Iranian Journal of Plant Biology 1-2: 13-24 (in Persian).

Cahill, J. P. (2004) Genetic diversity among varieties of Chia (*Salvia hispanica* L.). Genetic Resource and Crop Evolution 51(7): 773-781.

Carreras, M. E., Fuentes, E. and Merino, E. F. (1997) Seed protein patterns of nine species of Cactaceae. Biochemical Systematics and Ecology 25(1): 43-49.

Echeverrigaray, S. and Agostini, G. (2006) Genetic relationships between commercial cultivars and

www.SID.ir

Archive of SID

Brazilian accessions of *Salvia officinalis* L. based on RAPD markers. Review in Brasilian Plant Medicine Botucatu 8(esp.): 13-17.

Ehsanpour, A. A., Shojaie, B. and Rostami, F. (2010) Characterization of seed storage protein patterns of four Iranian pistachios using SDS-PAGE. Natural Science 2(7): 737-740.

Emre, I., Turgut-Balik, D. and Sahin, A. (2007) Electrophoretic analysis of total protein profiles of some *Lathyrus* L. (Sect. *Cicercula*) grown in Turkey. Pakistan Journal of Biological Sciences 10(17): 2890-2894.

Farkas, A., Papp, N., Horvath, G., Nemeth, T. S., Szabo, I. and Nemeth, T. (2008) RAPD based genetic diversity among *Salvia officinalis* L. populations. Farmacia Bucuresti 56(3): 339-343.

Freitas, R. L., Teixeira, A. R. and Ferreira, R. B. (2004) Characterization of the proteins from *Vigna unguiculata* seeds. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52(6): 1682-1687.

Fukuda, T., Maruyama, N., Kanazawa, A., Abe, J. and Shimamoto, Y. (2005) Molecular analysis and physicochemical properties of electrophoretic variants of wild soybean *Glycine soja* storage proteins. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53(9): 3658-3665.

Golparvar, A. R. and Hadipanah, A. (2013) Identification of the components of Sage (*Salvia officinalis* L.) and Thyme (*Thymus vulgaris* L.) cultivated in Isfahan climatic conditions. Electronic Journal of Biology 9(2): 42-45.

Haque, S., Pritesh, R., Anandan, A., Samantaray, S., Pradhan, S. K. and Singh, O. N. (2015) Genetic diversity study of seed proteins in rice drought tolerant donor accessions. Rice Genomics and Genetics 6(2): 1-5.

Iqbal, S. H., Ghafoor, A. and Ayub, N. (2005) Relationship between SDS-PAGE markers and ascochyta blight in chickpea. Pakistan Journal of Botany 37(1): 87-96.

Jafari, A., Farsi, M., Soleimanian Shafa, F. and Taghizadeh, N. (2009) Seed protein study on some population of *Salvia* (Lamiaceae) using electrophoresis technique in North-East of Iran. Asian Journal of Plant Sciences 8(4): 322-324.

Javaid, S., Ghafoor, A. and Anwar, R. (2004) Seed storage protein electrophoresis in groundnut for evaluating genetic diversity. Pakistan Journal of Botany 36(1): 25-29.

Kakaei, M. and Kahrizi, D. (2011) Study of seed proteins pattern of *Brassica napus* varieties via sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis. International Research Journal of Biotechnology 2(1): 26-28.

Kamel, E. A., Hassan, H. Z. and Ahmed, S. M. (2003) Electrophoretic characterization and the relationship between some Egyptian cruciferae. Journal of Biological Science 3(9): 834-842.

Kharrazian, N. (2009) Taxonomy and morphology of *Salvia spinosa* L. (Lamiaceae) in Iran. Taxonomy and Biosystematic 1(1): 9-20 (in Persian).

Magni, C., Scarafoni, A., Herndl, A., Sessa, F., Prinsi, B., Espen, L. and Duranti, M. (2007) Combined 2-D electrophoretic approaches for the study of white lupin mature seed storage proteome. Phytochemistry 68(7): 997-1007.

Masoumi, S. M., Kahrizi, D., Rostami-Ahmadvandi, H., Soorni, J., Kiani, S., Mostafaie, A. and Yari, Kh. (2012) Genetic diversity study of some medicinal plant accessions belong to Apiaceae family based on seed storage proteins patterns. Molecular Biology Reports 39(12): 10361-10365.

Mirjalili, S. A. and Mirzaei, N. H. (2005) Investigation of genetic variation and taxonomic relationships of *Lolium* species using seed storage proteins. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research 13(3): 257-270.

www.SID.ir

Archive of SID

Miskoska-Milevska, E., Dimitrievska, B., Poru Zoran, K. and Popovski, T. (2008) Differences in tomato seed protein profiles obtained by SDS-PAGE analysis. Journal of Agricultural Sciences 53(1): 13-23.

Monroy-Torres, R., Mancilla-Escobar, M. L., Gallaga-Solórzano, J. C., Medina-Godoy, S. and Santiago-García, E. J. R. (2008) Protein degestibility of chia seed (*Salvia hispanica* L.). Revista Salud Pública y Nutrición (RESPYN) 9(1): 1-9.

Mozaffarian, V. (1996) Dictionary of Iranian plant names. Farhang Moaser, Tehran.

Musibau, A. A., Charity, O. A. and Oyinkansola, O. O. (2013) Assessment of genetic variation in accessions of sesame (*Sesamum indicum* L.) and its crosses by seed protein electrophoresis. Journal of Agroalimentary Processes and Technologies 19(4): 383-391.

Nisar, M., Ghafoor, A., Khan, M. R., Ahmad, H., Qureshi, A. S. and Ali, H. (2007) Genetic diversity and geographic relationship among local and exotic chickpea germplasm. Parkistan Journal of Botany 39(5): 1575-1581.

Razavizadeh, R. and Rostami F. (2013) The use of protein patterns in genetic diversity analysis in some *Brassica napus* cultivars. Taxonomy and Biosystematics 5(16): 75-84 (in Persian).

Reales, A., Rivera, D., Palazón J. A. and Obón, C. (2004) Numerical taxonomy study of *Salvia* sect. *Salvia*. Botanical Journal of Linnaean Society 145(3): 353-371.

Ribeiro, A. C., Teixeira, A. R. and Ferreira, R. B. (2004) Characterization of globulins from common vetch (*Vicia sativa* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry 52(15): 4913-4920.

Rohlf, F. J. (1992) NTSYS-PC: numerical taxonomy and multivariate analysis system. Exeter Software, New York.

Sammour, R. H. (1999) Proteins of linseed (*Linum usitatissimum* L.), extraction and characterization by electrophoresis. Botanical bulletin of Academia Sinica, 40(2): 121-126.

Sanches-Yelamo, M. D., Ortiz, M. and Gogorcena, Y. (1995) Comparative electrophoretical studies of seed protein in som species of genera *Diplotaxis*, *Erucastrum* and *Brassica*. Taxon 41: 477-483.

Sepehry Javan, Z., Rahmani, F. and Heidari, R. (2012) Assessment of genetic variation of genus *Salvia* by RAPD and ISSR markers. Australian Journal of Crop Science 6(6): 1068-1073.

Seyedi, N, Jalali, S. Gh., Moghaddam, M., Tabari, M. and Mohammadi, S. A. (2010) Application of seed storage protein in intra-specific variation in three population of *Pistacia atlantica* Desf. Journal of Plant Biology 6(4): 1-14 (in Persian).

Sinha, K. N., Singh, M. and Kumar, Ch. (2012) Electrophoretic study of seed storage protein in five species of *Bauhinia*. IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences 4(2): 8-11.

Zhang, L., Zhao, H., Fan, X., Wang, M., Ding, Ch. and Yang, R. (2012) Genetic diversity among *Salvia miltiorrhiza* Bunge and related species inferred from nrDNA ITS sequences. Turkish Journal of Biology 36(3): 319-326.

www.SID.ir

Archive of SID

Assessment of genetic diversity among some accessions of sage (*Salvia officinalis* L.) using electrophoresis of seed storage proteins

Seyed Abbas Mirjalili *
Agricultural Jahad Institute of Technical and Vocartional Higher Education, AREEO, Tehran, Iran

Abstract
The genus *Salvia* (Lamiaceae) comprises over 900 species in the world, with a relatively wide dispersion in the Iran's flora. Until now, about 58 species of the genus have been reported and identified in Iran, in which 17 of them were endemic. In order to study, investigate and evaluate the intraspecific diversity, similarity and dissimilarity among Iranian *Salvia officinalis* accessions, an experiment was carried out using SDS-PAGE technique. In this study, the seeds from five accessions were collected from gene bank and were evaluated. The seed storage proteins were extracted by buffers and were measured. Phylogenetic relationships were analyzed according to presence and absence of bands on the gel. A dendrogram was prepared using calculation of the accession's similarity index. Mean comparison were done by Tukey's test. The seed protein contents showed significant differences ($P \leq 0.01$) among accessions. A total of 39 bands were indicated on the gel. The maximum diversity was detected in the accession No. 2 while, the lowest band's number were recorded with the accessions No. 1 and 5. Based on dendrogram, the accessions were divided into two groups; one includes accession No. 1 and 4 other accessions were located in the second group further classified into two subgroup including accessions No. 2 and 3 in one clade and accessions No. 4 and 5 in the other ones.

Key words: Electrophoresis, Iran, Phylogeny, *Salvia officinalis*

* a.mirjalili@itvhe.ac.ir

Copyright©2016, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

www.SID.ir