

Evaluation of allelic diversity using SDS-PAGE technique in leaf tissues of bread wheat

Mehdi Kakaei

Department of Agriculture, Payame Noor University, Tehran, Iran

Abstract

The present study was performed with the purpose of evaluating the genetic relationship between bread wheat genotypes based on leaf protein electrophoresis using the SDS-PAGE technique. In this study, soluble protein electrophoresis patterns were investigated in 16 genotypes of bread wheat. The concentration of the total leaf soluble proteins was determined using the Bradford and spectrophotometric methods. After staining using Coomassie blue R-250, in order to analyze the electrophoresis data, the presence and absence of the protein bands were scored one and zero, respectively. The similarity matrix was calculated and cluster analysis was performed based on Jaccard coefficient using UPGMA. The comparison of banding patterns of leaf soluble protein electrophoresis samples showed that not only were the protein bands on gels different in terms of location and molecular weight, but they also showed difference in terms of density and intensity. The studied genotypes were classified using cluster analysis and the genetic relationship between them was investigated. According to SDS-PAGE analysis, backcross roshan zemestaneh and Navid genotypes possessed all the polypeptides generated among the studied genotypes. Zare and backcross roshan zemestaneh genotypes had the highest number of protein bands (23 bands) and pishgam genotype had the lowest number of bands (13 bands). Based on the dendrogram of electrophoretic data and plot of the principal axis analysis, Bezostaya and Navid were the most different and genetically distanced genotypes. The results of this study could be useful in bread wheat breeding programs.

Keywords: Biodiversity, wheat, leaf protein, protein markers

* Corresponding Author: M_Kakaei@pnu.ac.ir

بررسی تنوع آلی با روش SDS-PAGE در بافت برگ گندم نان

مهدی کاکایی

گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

چکیده

پژوهش حاضر برای بررسی قرابت ژنتیکی بین ژنوتیپ‌هایی از گندم نان (*Triticum aestivum* L.) بر اساس مطالعات الکتروفورزی پروتئین‌های برگ با روش SDS-PAGE انجام شد. در پژوهش حاضر، الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های محلول برگ ۱۶ ژنوتیپ گندم نان بررسی شد. غلظت پروتئین‌های کل محلول برگ، با روش برادفورد و اسپکتروفتومتری تعیین شد. پس از رنگ آمیزی با کوماسی بلو R-250 برای تجزیه داده‌های الکتروفورزی، به حضور هریک از باندها عدد ۱ و به نبودن آنها عدد صفر داده شد. ماتریس تشابه محاسبه و تجزیه خوشه‌ای بر اساس ضریب تشابه جاکارد با روش UPGMA انجام شد. مقایسه الگوی باندهای حاصل از الکتروفورزی پروتئین‌های محلول در برگ نمونه‌های مطالعه‌شده نشان داد باندهای پروتئینی از نظر موقعیت روی ژل، وزن مولکولی، تراکم و شدت متفاوت بودند. با تجزیه خوشه‌ای، ژنوتیپ‌های مدنظر دسته‌بندی شدند و میزان قرابت ژنتیکی بین آنها بررسی شد. نتایج SDS-PAGE نشان دادند ژنوتیپ‌های نوید و بک کراس روشن زمستانه، همه پلی‌پپتیدهای ایجادشده بین ژنوتیپ‌های مطالعه‌شده را داشتند. ژنوتیپ‌های زارع و بک کراس روشن زمستانه بیشترین تعداد باند را (۲۳ باند) داشتند و ژنوتیپ پیشگام کمترین تعداد باند (۱۳ باند) را داشت. بر اساس دندروگرام داده‌های الکتروفورزی و نمودار حاصل از تجزیه به محورهای اصلی، ژنوتیپ‌های بزوستایا و نوید بیشترین اختلاف و فاصله ژنتیکی را داشتند. نتایج پژوهش حاضر می‌تواند برای برنامه‌های اصلاحی گندم نان مفید باشند.

واژه‌های کلیدی: پروتئین برگ، تنوع زیستی، گندم نان، نشانگر پروتئینی

Archive of SID

مقدمه

گندم (*Triticum aestivum* L.) مهم‌ترین غله و منبع غذایی در جهان است. گندم از نظر ویژگی‌های مختلف کمی و کیفی، سازگاری با عوامل محیطی و انواع مقاومت‌ها تنوع ژنتیکی وسیعی دارد (Naroei Rad and Farzanjoo, 2006). اصلاح نباتات بر پایه تنوع و گزینش بنا نهاده شده است و تنوع ژنتیکی زمینه فعالیت و انتخاب اصلاح‌گر را برای گزینش و دیگر عملیات اصلاحی افزایش می‌دهد (Abozari Gazafroodi *et al.*, 2006). وجود تنوع ژنتیکی برای انتخاب والدین در برنامه‌های به‌نژادی اهمیت بسیار دارد. از روش‌های بررسی تنوع ژنتیکی می‌توان به روش‌های مورفولوژیک، مولکولی و بیوشیمیایی اشاره کرد. اطلاع درباره تنوع و ارتباط ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها کمک بزرگی در تعیین راهبردهای توسعه محصولات به شمار می‌رود (Kakaei *et al.*, 2009). یکی از روش‌های بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های گیاهی، استفاده از روش الکتروفورز پروتئین است (Kakaei *et al.*, 2010). پروتئین‌ها به‌طور مستقیم با نوکلئیک اسیدها کدگذاری می‌شوند؛ بنابراین از لحاظ ژنتیکی، اختلاف در پروتئین‌ها باید در تغییر رفتار الکتروفورزی نمایان شود (Mahmoudzadeh *et al.*, 2003). الکتروفورز ژل پلی‌اکریل‌آمید برای تعیین وزن مولکولی پروتئین‌ها، روشی رایج و مهم در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی است. این روش ضمن ساده‌بودن، به مقدار اندکی نمونه برای انجام آزمایش نیاز دارد و قدرت تفکیک مناسب برای شناسایی و تعیین خلوص پروتئین‌ها دارد. مطالعه

تنوع ژنتیکی با روش SDS-PAGE برای به دست آوردن تنوع و فاصله ژنتیکی، از اندام‌های مختلف گیاهان موضوع بسیاری از پژوهش‌های علوم زیستی مانند تحقیقات Kakaei و همکاران (۲۰۰۹) بر کلزا، Salehi و همکاران (۲۰۱۵) بر بومادران، Mossavi و همکاران (۲۰۱۰) بر جمعیت‌های گندم وحشی، Seyedi و همکاران (۲۰۱۰) بر جمعیت‌های پسته وحشی و Mirjalili (۲۰۱۶) بر جمعیت مریم‌گلی دارویی بوده است. بررسی تنوع ژنتیکی گندم، متخصصان اصلاح نباتات را در شناسایی ظرفیت ژنتیکی صفات مرتبط با اهداف اصلاحی مهم این گیاه یاری می‌کند و مطالعه الگوپذیری تنوع ژنتیکی از تنوع جغرافیایی و اقلیمی ژنوتیپ‌ها نشان‌دهنده سازگاری‌های احتمالی آنها با محیط‌های متفاوت است (Romesburg, 1990). بیشتر صفات گیاهی که اهمیت اقتصادی فراوانی دارند به‌صورت کمی به ارث می‌رسند. این صفات، وراثت‌پذیری نسبتاً پایینی دارند و گزینش مستقیم آنها در مزرعه با مشکلاتی همراه است. همچنین انجام دادن عملیات اصلاحی درباره این صفات مشکل است. پژوهشگران اصلاح نباتات همیشه به دنبال یافتن نشانگرهای ژنتیکی و بیوشیمیایی‌اند که با این صفات پیوستگی داشته باشد تا بتوان از این نشانگرها برای معیارهای غیرمستقیم گزینش استفاده کرد. Razavizadeh و Ehsanpour (۲۰۱۳) در مطالعه پروتئین بذر هفت رقم سویا با روش SDS-PAGE بیان کردند ۱۱ باند پلی‌مورفیک برای تشخیص تنوع ژنتیکی شناسایی شده‌اند و ارقام دارای بیشترین و کمترین شباهت را شناسایی کرده‌اند. Ashrafi و همکاران (۲۰۱۲) در مطالعه تنوع پروتئین‌های

والدین در برنامه‌های به‌نژادی اهمیت زیادی دارد. از روش‌های مطالعه تنوع ژنتیکی می‌توان به روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی اشاره کرد. برای بهره‌وری مؤثرتر، از خزانه ژنی، ارزیابی تنوع ژنتیکی احتمالی در جمعیت‌های گندم لازم است؛ بنابراین، اهداف پژوهش حاضر عبارتند از: (۱) بررسی میزان تنوع ژنتیکی و پروتئینی بافت برگ در ژنوتیپ‌های گندم کشت‌شده در ایران و (۲) گروه‌بندی ژنوتیپ‌های مدنظر با تجزیه خوشه‌ای و با نشانگرهای پروتئینی (SDS-PAGE).

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: در پژوهش حاضر، از ۱۶ ژنوتیپ *T. aestivum* تهیه‌شده از بخش غلات مرکز تحقیقات کشاورزی استان همدان استفاده شد (جدول ۱).

جدول ۱- اسامی ژنوتیپ‌های مطالعه‌شده

ردیف	ژنوتیپ	ردیف	ژنوتیپ	ردیف	ژنوتیپ
۱	بزوستایا	۷	امید	۱۳	سرداری
۲	پیشگام	۸	نوید	۱۴	الوند
۳	سایسون	۹	بک کراس روشن زمستانه	۱۵	الموت
۴	DN-11	۱۰	زارع	۱۶	زرین
۵	شاهپسند	۱۱	Sara/Thb/vee		
۶	میهن	۱۲	شهریار		

استخراج، برگ‌ها در هاون چینی قرار داده شدند و در یخ و در حضور ازت مایع پودر شدند؛ سپس از پودر برگ به‌دست‌آمده برای استخراج پروتئین استفاده شد؛ بدین‌منظور ۱۰۰ میلی‌گرم از پودر به‌دست‌آمده از برگ هر ژنوتیپ با ۲ میلی‌لیتر بافر استخراج حاوی DTT-TCA-Acetone مخلوط

ذخیره‌ای دانه گونه‌های مختلف جنس *Papaver* ابراز کردند تنوع مطلوبی از این نظر بین گونه‌های یادشده وجود دارد. همچنین همبستگی معنی‌داری بین صفات زراعی مورفولوژیک و فیزیولوژیک با داده‌های حاصل از روش SDS-PAGE مشاهده و گزارش کردند.

به‌تازگی پیشرفت‌ها در زمینه زیست‌شناسی مولکولی و بیوتکنولوژی، ابزار قدرتمندی برای پژوهش‌های ژنتیک گیاهان عالی از جمله گیاهان زراعی فراهم کرده‌اند. شاید اساسی‌ترین و مفیدترین این ابزارها نشانگرهای مولکولی باشند. با این نشانگرها در هر مرحله‌ای از رشد گیاه می‌توان گیاهان مطلوب را به‌طور مستقیم براساس ژنوتیپ به‌جای فنوتیپ انتخاب کرد که این مسئله دوره اصلاحی را کوتاه‌تر می‌کند و صرفه‌جویی را در وقت و هزینه موجب می‌شود (Kardavan Ghabel *et al.*, 2013). وجود تنوع ژنتیکی برای انتخاب

استخراج پروتئین بافت برگ در مرحله

شروع ساقه‌دهی: برای استخراج پروتئین‌های بافت برگ، برگ‌ها در مرحله شروع ساقه‌دهی از مزرعه دانشگاه پیام‌نور اسدآباد جمع‌آوری و بلافاصله در ازت مایع منجمد شدند. نمونه‌ها تا زمان استخراج در فریزر -۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. هنگام

با غلظت ۰/۴۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) در چاهک‌های ژل قرار گرفت؛ سپس مجموعه‌ای از پروتئین‌های استاندارد نیز در چاهک ژل نشانده شد. الکتروفورز با ولتاژ ۵۰ ولت در ژل متراکم‌کننده به مدت ۳۰ دقیقه و با ولتاژ ۱۵۰ ولت در ژل جداکننده به مدت ۱/۵ ساعت انجام شد. با رسیدن رنگ نشانه به لبه پائینی ژل، جریان قطع شد.

رنگ‌آمیزی و رنگ‌بری ژل پلی‌اکریل

آمید: پس از الکتروفورز، رنگ‌آمیزی ژل با کوماسی بریلانت بلو R-250 انجام شد (Chen *et al.*, 1993). در این روش مراحل ثبوت و رنگ‌آمیزی پروتئین‌ها به‌طور هم‌زمان انجام شدند. پس از ۱/۵ ساعت قرار گرفتن ژل در محلول رنگ، رنگ‌بری آن با محلول رنگ‌بر (متانول، استیک اسید گلاسیال و آب مقطر) تا روشن شدن زمینه ژل ادامه یافت و سپس ژل اسکن شد. پس از این مرحله، با وزن مولکولی پروتئین‌های نمونه استاندارد، Rf (نسبت فاصله باند پروتئین تا چاهک به فاصله انتهای ژل از چاهک) مربوط به هر پروتئین محاسبه و با توجه به آن، رابطه بین Rf و وزن مولکولی ارزیابی شد؛ سپس Rf نمونه مجهول در رابطه ایجاد شده در نمودار استاندارد در شکل ۱ قرار داده و وزن مولکولی نمونه مجهول محاسبه شد. مقدار Rf از رابطه ۱ به دست آمد (Gomori, 1955).

$$\text{رابطه ۱} \quad \text{فاصله نقطه مرجع از نقطه مبدأ} / \text{فاصله طی شده پروتئین از مبدأ} = \text{Relative mobility}$$

نسخه 2.02e انجام شد. تجزیه خوشه‌ای براساس ضریب تشابه جاکارد انجام شد (Kakaei *et al.*, 2009) و در نهایت دندروگرام براساس الگوریتم UPGMA ترسیم شد.

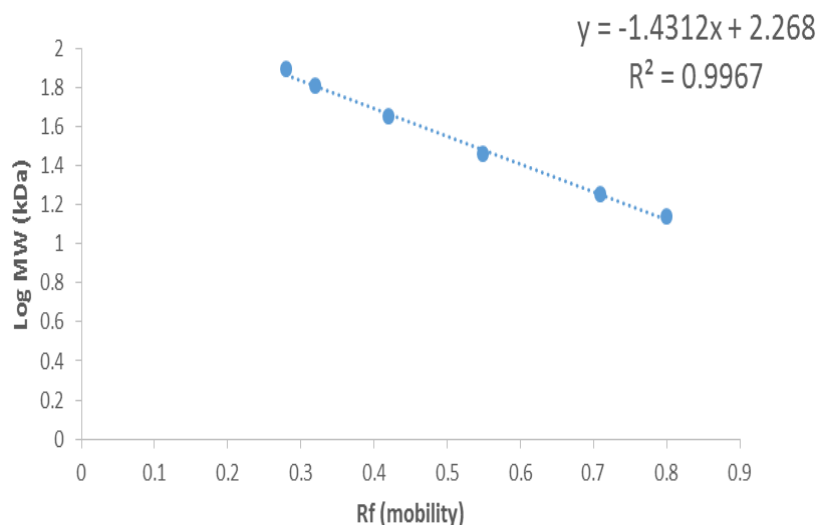
شد و مخلوط حاصل سه ساعت در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت؛ سپس در ساتریفیوژ یخچال‌دار در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۳۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه ساتریفیوژ و با مخلوط ماده شستشو (TCA and Acetone)، شستشو شد. در نهایت از پودر نسبتاً سفیدرنگ برای الکتروفورز استفاده شد (Kakaei *et al.*, 2010).

الکتروفورز پروتئین استخراج شده از بافت

برگ: در پژوهش حاضر برای الکتروفورز پروتئین از روش SDS-PAGE (الکتروفورز در ژل پلی‌اکریل‌آمید در حضور سدیم دودسیل سولفات) استفاده شد. SDS-PAGE در ژل جداکننده ۱۲/۵ درصد و ژل متراکم‌کننده ۵ درصد با روش Laemmli (۱۹۷۰) انجام شد. پس از استخراج پروتئین‌های برگ، مقدار غلظت پروتئین محلول نمونه‌ها مطابق روش Bradford (۱۹۷۶)، با استاندارد آلومین سرم گاوی با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل CECIL CE7250، شرکت Unired kingdom، انگلستان) اندازه‌گیری شد. ژل آماده شده در تانک الکتروفورز کوچک (مدل VU-80، شرکت مهندسی پزشکی نوژن پارس، ایران) قرار گرفت و تانک بالای و پائینی از بافرهای مربوطه پر شد. برای نمونه‌گذاری پس از آماده کردن نمونه‌ها در بافر الکتروفورز، مقدار ۱۷ میکرولیتر از هر نمونه با غلظت یکسان (از پروتئینی

تحلیل آماری: باندها براساس حضور و نبودن

در هر نمونه امتیازدهی شدند. برای تعیین فاصله ژنتیکی، ماتریس دوطرفه ارقام و متغیرها براساس صفر و ۱ تشکیل شد و سپس تحلیل داده‌ها از جمله تجزیه به محورهای اصلی با نرم‌افزار pc NTSYS



شکل ۱- نمودار Rf در مقابل لگاریتم وزن مولکولی پروتئین‌های نمونه استاندارد برای تعیین وزن مولکولی پروتئین‌ها در روش SDS-PAGE

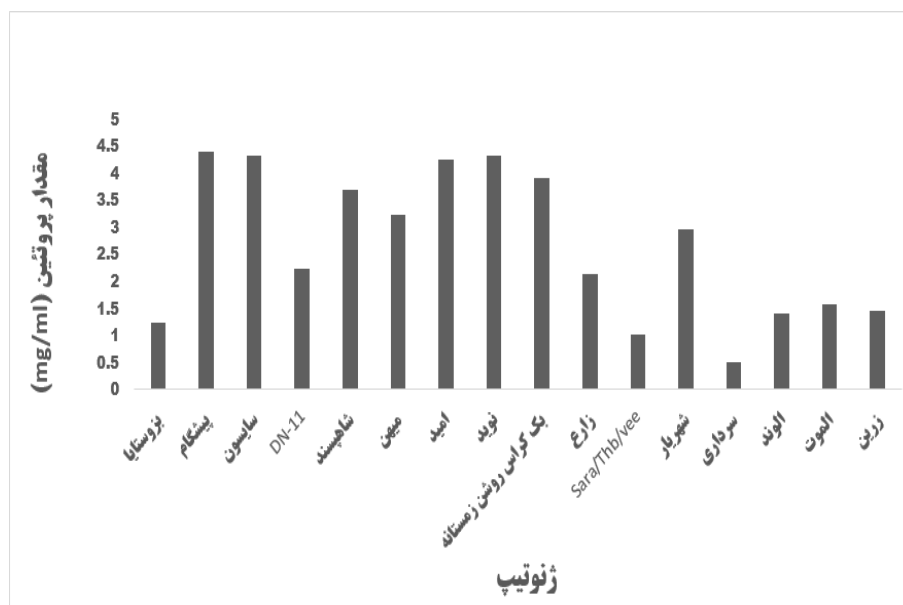
نتایج و بحث

باندها در همه ژنوتیپ‌ها یکسان بودند که احتمالاً پروتئین‌های اختصاصی گندم باشند؛ هرچند پروتئین‌های اختصاصی نیز بین ژنوتیپ‌ها موجود بودند. علامت پیکان روی تصویر ژل SDS-PAGE به باندهای حذف شده اشاره دارد.

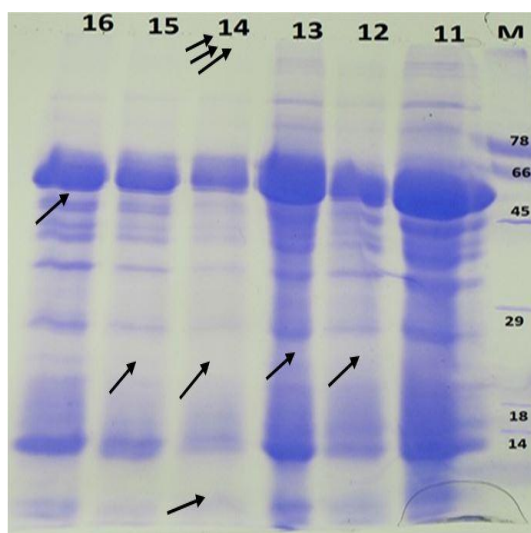
شکل ۲، پروتئین محلول کل ژنوتیپ‌های گندم بررسی شده را نشان می‌دهد. ژنوتیپ‌های نوید، سایسون و پیشگام بیشترین و ژنوتیپ‌های سرداری و Sara/Thb/vee کمترین مقدار پروتئین محلول کل را داشتند.

هرچه فاصله ژنتیکی جمعیت‌ها و والدین بیشتر باشد، هتروزیس بیشتری می‌توان مشاهده کرد. همچنین برای کاهش تعداد داده‌ها، افراد مشابه در گروه‌های مختلف دسته‌بندی می‌شوند و این مسئله از ضروریات مطالعات در کشاورزی است (Osmani and Siosemardeh, 2009).

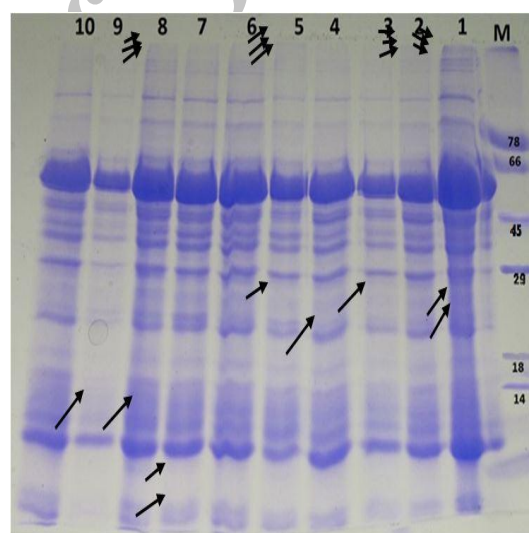
در پژوهش حاضر، SDS-PAGE، روش اصلی انتخاب شد. شکل‌های ۳ و ۴ به ترتیب الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های محلول برگ را در ژنوتیپ‌های ۱ تا ۱۰ و ۱۱ تا ۱۶ نشان می‌دهند. براساس شکل‌های ۳ و ۴، تراکم و میزان باندهای حاصل در ژنوتیپ‌ها، بسیار شبیه به همدیگر هستند؛ اما برخی از باندهای پروتئینی از نظر محل قرارگرفتن روی ژل، وزن مولکولی، تراکم و شدت با یکدیگر اختلاف نشان دادند. برای ۱۶ ژنوتیپ مطالعه شده بیشترین تعداد باند مربوط به ژنوتیپ ۱۰ و کمترین تعداد مربوط به ژنوتیپ ۲ بود که به ترتیب ۲۲ و ۱۱ باند داشتند. شکل ۳، ژنوتیپ شماره ۱ تا ۱۰، و شکل ۴، ژنوتیپ شماره ۱۱ تا ۱۶ را نشان می‌دهد. ژنوتیپ ۷، ۹ و ۱۰ بیشترین تعداد باند و ژنوتیپ ۲ کمترین تعداد باند را بین ژنوتیپ‌های بررسی شده داشتند. برخی از



شکل ۲- پروتئین محلول کل ژنوتیپ‌های گندم مطالعه‌شده



شکل ۴- الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های محلول بافت برگ در ژنوتیپ‌های شماره ۱۱ تا ۱۶- اسامی ژنوتیپ‌ها عبارتند از: ۱۱ (Sara/Thb/vee)، ۱۲ (شهریار)، ۱۳ (سرداری)، ۱۴ (الوند)؛ ۱۵ (الموت) و ۱۶ (زرین). پروتئین‌های اوترانسفرین (۷۸ کیلو دالتون)، آلومین گاوی (۶۶ کیلودالتون)، اوآلبومین (۴۵ کیلودالتون)، اکتینیدین (۲۹ کیلودالتون)، بتا - لاکتوگلوبولین (۱۸ کیلودالتون) و لیزوزیم (۱۴ کیلودالتون) نشانگر در ژل بودند. علامت پیکان به باندهای تشکیل‌نشده اشاره دارد.



شکل ۳- الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های محلول بافت برگ در ژنوتیپ‌های شماره ۱ تا ۱۰- اسامی ژنوتیپ‌ها عبارتند از: ۱ (بزوستایا)، ۲ (پیشگام)، ۳ (سایسون)، ۴ (DN-11)، ۵ (شاهپسند)، ۶ (میهن)، ۷ (امید)، ۸ (نوید)، ۹ (بک‌کراس روشن زمستانه) و ۱۰ (زارع). پروتئین‌های اوترانسفرین (۷۸ کیلو دالتون)، آلومین گاوی (۶۶ کیلودالتون)، اوآلبومین (۴۵ کیلودالتون)، اکتینیدین (۲۹ کیلودالتون)، بتا - لاکتوگلوبولین (۱۸ کیلودالتون) و لیزوزیم (۱۴ کیلودالتون) نشانگر در ژل بودند. علامت پیکان به باندهای تشکیل‌نشده اشاره دارد.

کیلودالتونی افزایش یافت. در برنامه‌های به‌نژادی و گروه‌بندی ذخایر ژنتیکی گندم، از نشانگرهای مختلف مورفولوژیک پروتئینی و DNA استفاده شده است (Fahima et al., 1998). شکل ۵، دندروگرام داده‌های الکتروفورزی حاصل از تحلیل داده‌های الکتروفورزی براساس باندهای پروتئین‌های ذخیره‌ای بافت برگ ژنوتیپ‌های گندم نان را با روش UPGMA نمایش می‌دهد. خط برش در مقیاس ۰/۷۹ ژنوتیپ‌ها را به سه گروه تقسیم کرده است. ژنوتیپ‌های شماره ۱، ۵ و ۱۴ در گروه اول، ژنوتیپ‌های ۳، ۴، ۶، ۷، ۹، ۱۰، ۱۲، ۱۱، ۱۳، ۱۵ و ۱۶ در گروه دوم و ژنوتیپ‌های شماره ۲ و ۸ در گروه سوم قرار گرفتند که براساس این گروه‌بندی، ژنوتیپ‌های شماره ۱ و ۸ بیشترین اختلاف را داشتند. از این تنوع و فاصله به‌دست‌آمده بین ژنوتیپ‌های یادشده (ژنوتیپ‌های شماره ۱ و ۸) می‌توان در برنامه‌های به‌نژادی برای تلاقی و به دست آوردن هتروزیس برتر بهره‌برداری کرد؛ البته برای دستیابی به این نتیجه، مطالعه صفات مورفولوژیک، فیزیولوژیک و نیز سایر صفات مؤثر دیگر و انطباق این صفات با داده‌های حاصل از مطالعه SDS-PAGE بافت برگ پیشنهاد می‌شود. Zargani و همکاران (۲۰۱۴) در پژوهشی بر برخی لاین‌های دابل‌هاپلوئید گندم نان با نشانگر ریزماهواره و با روش‌های مطالعه گروه‌بندی در تجزیه خوشه‌ای (مانند الگوریتم UPGMA و با ضرایب تشابه)، ژنوتیپ‌های مطالعه‌شده را در سه گروه دسته‌بندی و بیان کردند نشانگرهای ریزماهواره، نشانگرهای بسیار مناسبی برای تفکیک لاین‌ها و ژنوتیپ‌های گندم هستند.

جدول ۲، تنوع نوارهای پروتئینی بافت برگ ژنوتیپ‌های مختلف گندم نان را با وزن مولکولی تقریبی برحسب کیلودالتون و حرکت نسبی آنها نشان می‌دهد. براساس این جدول، ژنوتیپ‌های ۷، ۹ و ۱۰، همه پلی‌پپتیدهای ایجادشده را (نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها) داشتند؛ ولی سایر ژنوتیپ‌ها پلی‌پپتیدهای حذف‌شده و ایجادشده داشتند. پلی‌پپتیدهای ۱۳۳/۰۴، ۱۱۲/۹۷ و ۹۵/۴۹ کیلودالتون در ژنوتیپ‌های شماره ۱، ۲، ۸ و ۱۴ ایجاد نشده‌اند؛ در حالی که در سایر ژنوتیپ‌ها این پلی‌پپتیدها شناسایی پذیر هستند. ژنوتیپ‌های ۱ تا ۶ نیز پلی‌پپتید ۳۱/۶۲ و ۲۶/۳۰ کیلودالتونی را ندارند. ژنوتیپ‌های شماره ۲ و ۸ نیز پلی‌پپتید ۱۵/۴۸، ۱۳/۴۸، ۱۲/۵۸ و ۸/۹۱ کیلودالتونی را ندارند. این اختلاف در تشکیل باند پروتئینی نشان‌دهنده تنوع بین ژنوتیپ‌های بررسی‌شده است؛ زیرا این ژنوتیپ‌ها ویژگی‌های مورفولوژیک، فیزیولوژیک و ... متفاوتی دارند که در این مطالعه از منظر پلی‌پپتید (باند پروتئینی ایجادشونده) اختلاف ژنوتیپ‌ها نمایان شده است. ازسویی به دلیل اینکه زمان تولید و ایجاد این ژنوتیپ‌ها یکسان نبوده است و در سالیان متوالی این ژنوتیپ‌ها آزاد شده‌اند و اهداف اصلاحی ویژه خود را نیز داشته‌اند؛ بنابراین، اختلافات و تنوع در صفات موجود در این ژنوتیپ‌ها مانند نوع تولید پلی‌پپتید یا پلی‌پپتیدهای ویژه دور از انتظار نیست.

Amini و Ehsanpour (۲۰۰۹) در مطالعه برگ گیاه *Lycopersicon esculentum* cv. Isfahani با روش SDS-PAGE ابراز کردند در تنش شوری در گوجه‌فرنگی رقم اصفهانی بیان پروتئین‌های ۴۰، ۹۱ و ۱۱۰ کیلودالتونی برگ کاهش و بیان پروتئین‌های ۲۶، ۲۰ و ۵۰ کیلودالتونی ساقه و ۳۰ و ۷۵

جدول ۲- تنوع نوارهای پروتئینی بافت برگ ژنوتیپ‌های مختلف گندم نان با وزن مولکولی تقریبی برحسب کیلودالتون و حرکت نسبی آنها

نوار	Rf	لگاریتم وزن مولکولی	آنتی لگاریتم وزن مولکولی	شماره ژنوتیپ															
				۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵	۱۶
۱	۰/۱	۲/۱۲۴	۱۳۳/۰۴	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۲	۰/۱۵	۲/۰۵۳	۱۱۲/۹۷	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۳	۰/۲۰	۱/۹۸	۹۵/۴۹	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۴	۰/۲۶	۱/۸۹	۷۷/۶۲	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۵	۰/۳۱	۱/۸۲	۶۶/۰۶	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۶	۰/۳۵	۱/۷۶	۵۷/۵۴	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۷	۰/۳۷	۱/۷۳	۵۳/۷۰	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۱	۰	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۸	۰/۳۹	۱/۷	۵۰/۱۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۰	۰
۹	۰/۴۰	۱/۶۹	۴۸/۹۷	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۱۰	۰/۴۲	۱/۶۶	۴۵/۷۰	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۱۱	۰/۴۸	۱/۵۸	۳۸/۰۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۱۲	۰/۵۰	۱/۵۵	۳۵/۴۸	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۱۳	۰/۵۳	۱/۵	۳۱/۶۲	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۱۴	۰/۵۷	۱/۴۵	۲۸/۱۸	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۱۵	۰/۵۹	۱/۴۲	۲۶/۳۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۱۶	۰/۶۵	۱/۳۳	۲۱/۳۷	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۱۷	۰/۶۸	۱/۲۹	۱۹/۴۹	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۱
۱۸	۰/۷۱	۱/۲۵	۱۷/۷۸	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۱۹	۰/۷۵	۱/۱۹	۱۵/۴۸	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۱
۲۰	۰/۷۹	۱/۱۳	۱۳/۴۸	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۱
۲۱	۰/۸۲	۱/۱	۱۲/۵۸	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۱
۲۲	۰/۹۲	۰/۹۵	۸/۹۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۱
۲۳	۰/۹۶	۰/۸۹	۷/۷۶	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱

ترتیب اسامی ژنوتیپ‌ها براساس جدول ۱ است. اعداد ۱ و صفر به ترتیب بیان‌کننده وجود و نبودن نوار پروتئینی ویژه‌ای است.

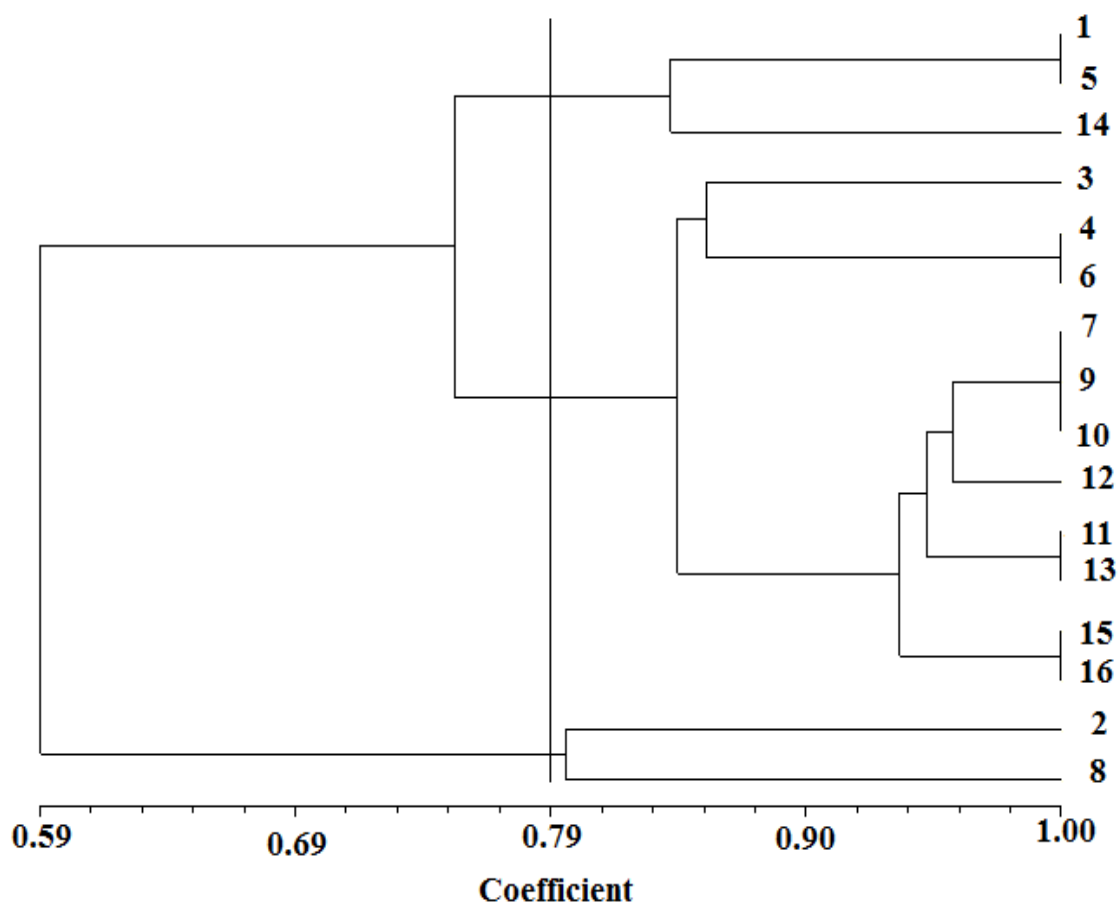
اساس اختلاف ژنوتیپ شماره ۱ و ۸ کاملاً مشهود است. در این راستا Atri و همکاران (۲۰۱۲) در مطالعه پروتئین‌های بذر *Artemisia spicigera* L. از تجزیه خوشه‌ای و تجزیه PCA در راستای مطالعه تنوع ژنتیکی استفاده کردند. Seyedi و همکاران (۲۰۱۰) در مطالعه‌ای با عنوان کاربرد پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر در مطالعه تنوع درون‌گونه‌ای

نتایج حاصل از نمودار تجزیه به محورها اصلی که براساس پروتئین‌های ذخیره‌ای بافت برگ ژنوتیپ‌های گندم نان ترسیم شده است (شکل ۶)، منطبق بر نتایج به‌دست‌آمده از تجزیه خوشه‌ای است. براساس شکل ۶، ژنوتیپ شماره ۲ و ۸ در گروه اول، ژنوتیپ شماره ۱ و ۱۴ در گروه دوم و سایر ژنوتیپ‌ها در گروه سوم قرار گرفتند. بر این

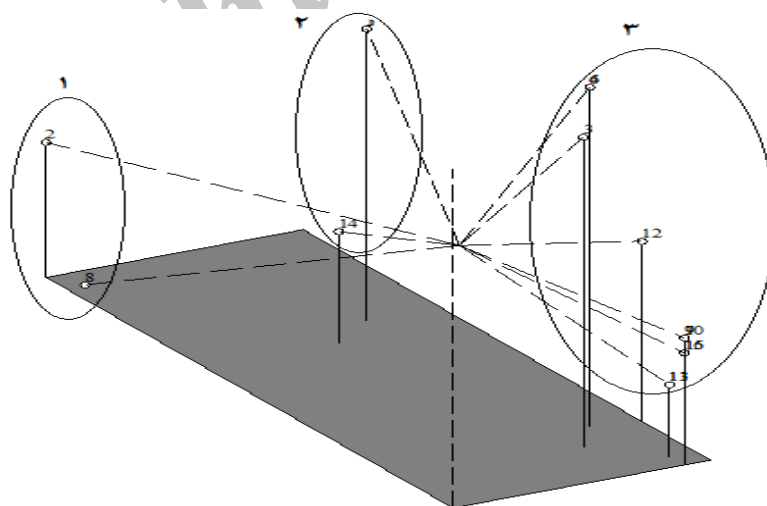
همکاران (۲۰۱۴) همسو است. همه ژنوتیپ‌هایی که در گروه آماری اول (۱، ۵ و ۱۴) قرار دارند با همه ژنوتیپ‌های قرارگرفته در گروه آماری سوم (۲ و ۸) از نظر فاصله در دندروگرام، دورترین فاصله را دارند و در جدول تشابه جاکارد نیز این فاصله (تشابه‌نداشتن) مشخص است. برای نمونه، ژنوتیپ‌های ۱ با ۸، ۱ با ۲، ۲ با ۵، ۵ با ۸، ۸ با ۱۴ با ۲ و ۱۴ با ۸ نسبت به سایر داده‌های جدول، تشابه کمتری داشتند که نشان‌دهنده فاصله بیشتر آنها است. ژنوتیپ‌هایی که تشابه دارند از لحاظ نزدیکی ژنتیکی نسبت به هم، قابلیت تلاقی و انتخاب را برای نقش والد ندارند؛ ولی ژنوتیپ‌هایی که تشابه کمتری دارند یا به عبارتی اختلاف دارند، شایستگی انتخاب شدن برای نقش والد و در نهایت، تلاقی را برای ایجاد نتاج مطلوب‌تر در طرح‌های تلاقی دارند. Tajdoost و همکاران (۲۰۱۲) نیز استفاده از روش ماتریس تشابه را در اکوتیپ‌های سس زراعی مطالعه کرده و آن را روشی مناسب برای تعیین فاصله ژنتیکی یافته‌اند. Osmani و Siosemardeh (۲۰۰۹)، در مطالعه اکوتیپ‌های گندم سرداری از ضریب تشابه جاکارد استفاده کردند. Mohamadi و همکاران (۲۰۱۴) و Roz و همکاران (۲۰۱۰) نیز از ضرایب تشابه جاکارد در برخی ژنوتیپ‌های گندم نان با نشانگر ریزماهواره استفاده کردند. Calagari و Salehi-shanjani (۲۰۱۰)، Mohammadi و همکاران (۱۹۹۹) و Ahmed و همکاران (۲۰۰۸) با ارزیابی پروتئین‌های محلول با روش SDS-PAGE به ترتیب، گونه‌های مطالعه شده پده، گندم نان و گندم را گروه‌بندی کردند.

جمعیت‌های پسته وحشی، با تجزیه خوشه‌ای با روش Ward، جمعیت‌های پسته وحشی را در سه گروه آماری طبقه‌بندی کردند و آن را روشی مناسب برای تفکیک جمعیت‌های مطالعه‌شده دانستند. در پژوهشی دیگر Mirjalili (۲۰۱۶) در مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مریم‌گلی دارویی با روش SDS-PAGE، پنج جمعیت مطالعه‌شده را در دو گروه آماری تقسیم‌بندی و ابراز کردند تحلیل خوشه‌بندی، داده‌هایی فراهم می‌کند که بررسی روابط فیلوژنتیک را بین گونه‌ها و جمعیت‌ها امکان‌پذیر می‌کند.

جدول ۳ ماتریس تشابه جاکارد را بر اساس نشانگر پروتئینی بافت برگ ژنوتیپ‌های گندم نان نشان می‌دهد. ژنوتیپ ۸ با ۳ کمترین تشابه (۰/۵۲۱۷) را دارند؛ اگرچه ژنوتیپ ۲ در گروه آماری دوم قرار دارد؛ ولی دوباره توانسته است در دندروگرام، فاصله خود را با ژنوتیپ ۸ حفظ کند و ژنوتیپ‌های ۵ با ۱؛ ۶ با ۴، ۹، ۱۰؛ ۱۱ با ۷؛ ۱۰ و ۱۱ با ۹؛ ۱۱ با ۱۳؛ ۱۱ با ۱۶؛ ۱۵ بیشترین تشابه را دارند. Zargani و همکاران (۲۰۱۴) بیشترین میزان تشابه را بین لاین‌های مطالعه‌شده گندم نان با باندهای ایجادشده با نشانگر ریزماهواره (۰/۹۷) و کمترین میزان تشابه (۰/۸۹) گزارش و بیان کردند این ضریب تشابه زیاد، نشان‌دهنده شباهت فراوان موجود بین مجموعه لاین‌های بررسی‌شده است و نیز افزودند این شباهت تحت اثر تعداد ژنوتیپ مورد مطالعه و تعداد آغازگر به کاررفته است. در پژوهش حاضر بیشترین میزان تشابه مشاهده‌شده ۰/۹۵ تا ۱ درصد و کمترین مقدار این تشابه ۰/۵ بود که با نتایج به دست آمده از مطالعه Zargani و



شکل ۵- دندروگرام داده‌های الکتروفورزی حاصل از تحلیل داده‌های الکتروفورزی براساس باندهای پروتئین‌های ذخیره‌ای بافت برگ ژنوتیپ‌های گندم نان با روش UPGMA- اعداد ۱ تا ۱۲ شماره ژنوتیپ‌های گندم مطابق جدول شماره ۱ هستند.



شکل ۶- نمودار حاصل از تجزیه به محورها اصلی براساس پروتئین‌های ذخیره‌ای بافت برگ ژنوتیپ‌های مطالعه‌شده گندم نان- اعداد ۱ تا ۱۲ شماره ژنوتیپ‌های گندم مطابق جدول شماره ۱ هستند.

جدول ۳- ماتریس تشابه ضرایب جاکارد بر اساس نشانگر پروتئینی بافت برگ ژنوتیپ‌های گندم نان

نوید (۸)	امید (۷)	میهن (۶)	شاهپسند (۵)	DN-11 (۴)	سایسون (۳)	پیشگام (۲)	بزوستایا (۱)		
							۱	۱	
						۱	۰/۷۲۲۲	۲	
					۱	۰/۵۲۳۸	۰/۷۶۱۹	۳	
				۱	۰/۸۵۷۱	۰/۵۷۱۴	۰/۸۰۹۵	۴	
			۱	۰/۸۰۹۵	۰/۷۶۱۹	۰/۷۲۲۲	۱	۵	
		۱	۰/۸۰۹۸	۱	۰/۸۵۷۱	۰/۵۷۱۴	۰/۸۰۹۵	۶	
	۱	۰/۸۶۹۵	۰/۷۸۲۶	۰/۸۶۹۵	۰/۸۲۶۰	۰/۵۶۵۲	۰/۷۸۲۶	۷	
۱	۰/۶۰۸۶	۰/۵۴۵۴	۰/۶۸۴۲	۰/۵۴۵۴	۰/۵	۰/۸	۰/۶۸۴۲	۸	
۰/۶۰۸۶	۱	۰/۸۶۹۵	۰/۷۸۲۶	۰/۸۶۹۵	۰/۸۲۶۰	۰/۵۶۵۲	۰/۷۸۲۶	۹	
۰/۶۰۸۶	۱	۰/۸۶۹۵	۰/۷۸۲۶	۰/۸۶۹۵	۰/۸۲۶۰	۰/۵۶۵۲	۰/۷۸۲۶	۱۰	
۰/۶۰۸۶	۱	۰/۸۶۹۵	۰/۷۸۲۶	۰/۸۶۹۵	۰/۸۲۶۰	۰/۵۶۵۲	۰/۷۸۲۶	۱۱	
۰/۶۳۶۳	۰/۹۵۶۵	۰/۹۰۹۰	۰/۸۱۸۱	۰/۹۰۹۰	۰/۸۶۳۶	۰/۵۹۰۹	۰/۸۱۸۱	۱۲	
۰/۵۶۵۲	۰/۹۵۶۵	۰/۸۲۶۰	۰/۷۳۹۱	۰/۸۲۶۰	۰/۷۸۲۶	۰/۵۲۱۷	۰/۷۳۹۱	۱۳	
۰/۷۲۲۲	۰/۷۳۹۱	۰/۶۸۱۸	۰/۸۴۲۱	۰/۶۸۱۸	۰/۶۳۶۳	۰/۵۷۸۹	۰/۸۴۲۱	۱۴	
۰/۵۶۵۲	۰/۹۵۶۵	۰/۸۲۶۰	۰/۷۳۹۱	۰/۸۲۶۰	۰/۸۶۳۶	۰/۵۲۱۸	۰/۷۳۹۱	۱۵	
۰/۵۶۵۲	۰/۹۵۶۵	۰/۸۲۶۰	۰/۷۳۹۱	۰/۸۲۶۰	۰/۸۶۳۶	۰/۵۲۱۸	۰/۷۳۹۱	۱۶	

ادامه جدول ۳

بک کراس روشن زمستانه (۹)	زارع (۱۰)	Sara/Thb/vee (۱۱)	شهریار (۱۲)	سرداری (۱۳)	الوند (۱۴)	الموت (۱۵)	زرین (۱۶)		
								۱	۹
								۱	۱۰
								۱	۱۱
			۱	۰/۹۱۳۰	۰/۹۵۶۵	۰/۹۵۶۵	۰/۹۵۶۵	۰/۹۵۶۵	۱۲
			۱	۰/۹۱۳۰	۰/۹۵۶۵	۰/۹۵۶۵	۰/۹۵۶۵	۰/۹۵۶۵	۱۳
				۱	۰/۷۷۲۷	۰/۷۷۲۷	۰/۷۳۹۱	۰/۷۳۹۱	۱۴
					۱	۰/۶۹۵۶	۰/۹۱۳۰	۰/۹۱۳۰	۱۵
						۱	۰/۶۹۵۶	۰/۹۱۳۰	۱۶

جمع بندی

تنوع ژنتیکی آسیب پذیری شدید محصولات زراعی را در برابر تنش‌های محیطی، آفات، بیماری‌ها و در نتیجه کاهش عملکرد را موجب می‌شود (Osmani and Siosemardeh, 2009). در حال حاضر نشانگرهای مولکولی متعددی برای

روش‌های سنتی به نژادی به تدریج تنوع ژنتیکی را کاهش می‌دهند و این کاهش می‌تواند برای آینده برنامه‌های اصلاحی خطر آفرین باشد (Morales Corts and Crespo Martinez, 2009). کاهش

روند انتقال و جریان ژنی را از ارقام وحشی به ارقام زراعی ارزیابی کرد.

سپاسگزاری

از همکاری جناب آقای مهندس مهرداد چایچی برای در اختیار قرار دادن برخی از مواد پژوهشی حاضر، همکاری دکتر علی مصطفایی و سایر افراد سپاسگزاری می‌شود.

References

- Abozari Gazafroodi, A., Honarneghad, R., Fotokian, M. and Alami, A. (2006) The correlation and path analysis of agronomic traits in rice. *Science and Technology of Agriculture and Natural Resources* 2: 99-106 (in Persian).
- Ahmed, K., Ahmed, A., Abbas, Z., Gulfraz, M., Shahid Masood, M. and Kisana, N. S. (2008) Genetic diversity in wheat (*Triticum aestivum* L.) as revealed by SDS-PAGE analysis. *International Journal of Applied Agricultural Research* 3(1): 1-8.
- 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(1-2): 13-24 (in Persian).
- Ashrafi, R., Najafy, A., Shaban, M. and Fathi, M. (2012) Evaluation of diversity seed storage proteins and some morphological traits in various species of *Papaver*. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants* 28(3): 385-398 (in Persian).
- Atri, M., Chehregani Rad, A. and Yousefi, S. (2012) Study of floristic-ecologic diversity and electrophoresis pattern of seed storage proteins in *Artemisia spicigera* L. in the North-West of Iran using D.S.S. method. *Journal of Plant Biology* 12(4): 37-50 (in Persian).
- برآورد تنوع ژنتیکی وجود دارند؛ ولی الکتروفورز پروتئین‌ها همواره روشی ساده و مرسوم برای برآورد تنوع ژنتیکی در گیاهان به شمار رفته است؛ زیرا ارتباط آنها با بخش فعال ماده ژنتیکی (ژن‌های ساختاری) بیشتر از اغلب نشانگرهای مبتنی بر DNA است (Morales Corts and Crespo Martinez, 2009). منطبق بودن نتایج تجزیه خوشه‌ای با نتایج تجزیه به محورهای اصلی نشان می‌دهد گروه‌بندی درست انجام شده است. پلی‌پپتیدهای ایجاد شده و حذف شده در برخی ژنوتیپ‌ها نشان‌دهنده تنوع پلی‌پپتیدی و در نتیجه تنوع ژنتیکی بین همه مواد آزمایش مطالعه شده است. الگوی الکتروفورزی پروتئین‌ها قادر است باند را شناساگر مولکولی معرفی کند. الگوی باندهای پروتئینی و سطح بیان پروتئین‌های ذخیره‌ای مشابه با گزارش حاضر می‌تواند در شناسایی ژنوتیپ‌ها و برنامه‌های به‌نژادی استفاده شود. همچنین از آنجا که تلاقی ژنوتیپ‌هایی که از نظر ژنتیکی دورتر هستند تنوع بیشتری می‌تواند ایجاد کند و براساس نتایج پژوهش حاضر، نشانگرهای بیوشیمیایی مانند SDS-PAGE برای تفکیک و شناسایی ژنوتیپ‌های مختلف گندم مناسب هستند. از این نشانگر در گروه‌بندی ژنوتیپ‌های گندم و در شناسایی ژنوتیپ‌های مختلف متحمل به تنش‌های زیستی و غیرزیستی می‌توان بهره‌برداری کرد. پیشنهاد می‌شود به استفاده از این روش و سایر روش‌های مولکولی برای تفکیک مطلوب ژنوتیپ‌ها در برنامه‌ریزی اصلاحی برای ایجاد جمعیت‌های متنوع‌تر توجه شود. ازسویی با مقایسه نتایج پژوهش‌های مشابه با نتایج ارزیابی SDS-PAGE بر ارقام وحشی، در آینده می‌توان

- Bradford, M. M. (1976) A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Calagari, M. and Salehi-Shanjani, P. (2010) Study of genetic variation in *Populus euphratica* Oliv. by evaluating soluble proteins through SDS-PAGE. *Iranian Journal of Forest* 2(3): 253-261 (in Persian).
- Chen, H. Y., Cheng, H. and Bjercknes, M. (1993) One-Step coomassie brilliant blue R-250 staining of proteins in polyacrylamide gel. *Analytical Biochemistry* 212(1): 295-296.
- Fahima, T., Roder, M., Grama, A. and Nevo, E. (1998) Microsatellite DNA polymorphism divergence in *Triticum dicoccoides* accessions highly resistant to yellow rust. *Theoretical and Applied Genetics* 96: 187-195.
- Gomori, G. (1955) Preparation of buffers for use in enzyme studies. *Methods in Enzymology* 1: 138-146.
- Kakaei, M., Zebarjadi, A. R. and Mostafaie, A. (2009) Comparison of genetic and morpho-physiological distance via SDS-PAGE marker in some rapeseed genotypes. *Agriculture Biotechnology* 2: 79-93 (in Persian).
- Kakaei, M., Zebarjadi, A. R. and Mostafaie, A. (2010) Study of protein pattern in *Brassica napus* genotypes under non-stress and drought stress conditions. *Agricultural Biotechnology* 9(2): 49-57 (in Persian).
- Kardavan Ghabel, V., Bagher Bagherieh Najjar, M., Alishah, O. and Soltanloo, H. (2013) Correlation analysis of agronomic, fiber traits and AFLP markers in hybrid cotton (*Gossypium Hirsutum* × *Gossypium Barbadosense*). *Journal of Crop Breeding* 5(12): 63-74.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Mahmoudzadeh, A., Haidari, R. and Jamalomid, M. (2003) Estimation of genetic distance among tea varieties using protein electrophoresis and polymorphism for esterase. *Journal of Agriculture Sciences Natural Research* 10: 73-80 (in Persian).
- Mirjalili, S. A. (2016) Assessment of genetic diversity among some accessions of sage (*Salvia officinalis* L.) using electrophoresis of seed storage proteins. *Iranian Journal of Plant Biology* 8(28): 79-107.
- Mohammadi, V., Ahmadian-tehrani, P., Abd-Mishani, S. and Ghannadha, M. R. (1999) Study on genetic diversity in wild diploid wheat (*Triticum tauschii*) using seed storage proteins electrophoresis. *Iranian Journal of Agriculture Science* 30(1): 55-64 (in Persian).
- Mohamadi, M., Mirfakhraee, S. R. G. and Abbasi, A. R. (2014) Genetic diversity in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) as revealed by microsatellite markers and association analysis of physiological traits related to spring cold stress. *Genetic New Journal* 9(3): 279-288.
- Morales Cortes, M. R. and Crespo Martinez, M. C. (2009) Variation of PGM and IDH isozymes sor identification of alfalfa varieties. *Euphytica* 112: 137-143.
- Mossavi, Z., Tahernezhad, Z., Zamani, M. J. and Emam jomeh, A. (2010) Studying of glutenin subunits diversity in *Aegilops tauschii* accessions by SDS-PAGE method. *Journal of Agriculture and Plant Breeding* 6(1): 65-73 (in Persian).
- Naroei Rad, M. and Farzanjoo, M. (2006) Genetic diversity and factor analysis of morphological traits of wheat landraces of Sistan and Baluchestan. *Research and Development Journal* 73: 50-57.
- Osmani, G. and Siosemardeh, A. (2009)

- Study of genetic diversity of sardari wheat ecotypes using AFLP marker and agronomic traits. Science and Technology of Agriculture and Natural Resources 13(47): 301-319.
- Razavizadeh, R. and Ehsanpour, A. A. (2013) Application of seed storage protein marker for identification of seven soybean (*Glycine max*) cultivars. Journal of Cell and Tissue 3(4): 319-326.
- Romesburg, H. C. (1990) Cluster Analysis for Researchers. Malabar, Florida: Robert E. Krieger Publishing Co. (Reprint of 1984 edition.) Charles Romesburg, *Utah State University*.
- Roz, M., Ahmadi, J., Garoosi, Gh. and Biki, A. H. (2010) Genetic variation of some tolerant and susceptible genotypes of bread wheat using microsatellite markers ISSR. Genetic New Journal 5(4): 69-76.
- Salehi, H., Chehregani Rad, A. K., Atri, M. and Mohsen zadeh, F. (2015) Study of biodiversity using DSS method and seed storage protein comparison of populations in two species of *Achillea* (L) in West of Iran. Taxonomy and Biosystematics 5(16): 55-68 (in Persian).
- Seyedi, N., Ali Jalali, S. G., 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 2(6): 1-14 (in Persian).
- Tajdoost, S., Khavari-Nejad, R. A., Meighani, F., Zand, E. and Noormohammadi, Z. (2012) Assessment of genetic diversity in *Cuscuta campestris* yunker ecotypes based on their molecular and protein markers. Environmental Sciences 93-108 (in

Persian).