فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۲۸، شمارهٔ ۳، صفحهٔ ۳۹۸-۳۸۵ (۱۳۹۱)

بررسی تنوع پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه و برخی صفات مورفولوژیک گونه‌های مختلف جنس *Papaver*

رضا اشرفی[۱]، عبداله نجفی*[۲]، مراد شعبان[۱] و مجتبی فتحی[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی کرمانشاه
۲*- نویسنده مسئول، استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی کرمانشاه
پست الکترونیک: nadjaphy@yahoo.com
۳- کارشناس، شرکت خدمات حمایتی کشاورزی اردبیل

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۸۹ تاریخ اصلاح نهایی: اردیبهشت ۱۳۹۰ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹۰

چکیده

این آزمایش به منظور بررسی پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه هفت گونه مختلف *Papaver* از مناطق مختلف استان اردبیل با روش SDS-PAGE انجام شد. اطلاعات حاصل از امتیازدهی نوارهای پروتئین‌ها در مجموع ۲۰ مکان را در گونه‌ها شناسایی کرد. بیشترین تعداد نوار مربوط به گونه‌های *P. rhoeas* و *P. bracteatum* با ۱۷ نوار بود. کمترین تعداد نوار مربوط به گونه‌های *P. argemone* و *p. somniferum* با ۱۳ نوار پروتئینی بود. تجزیه خوشه‌ای براساس ماتریس تشابه جاکارد، گونه‌های مختلف را در چهار گروه قرار داد. در گروه اول، *P. somniferum*؛ گروه دوم، *P. oreintale*، *P. bracteatum*، *P. lasiotrix* و *P. rhoeas*؛ گروه سوم، *P. dubium* و در گروه چهارم، *P. argemone* قرار گرفت. گونه‌های مختلف از نظر صفات مورفولوژیک (رنگ و شکل گلبرگ، رنگ و اندازه بذر و ارتفاع گیاه) تنوع خوبی نشان دادند که براساس تجزیه خوشه‌ای گونه‌های مورد بررسی در سه گروه جدا قرار گرفتند. آزمون مانتل برای تعیین ارتباط بین داده‌های مورفولوژیک و پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه انجام شد. این آزمون همبستگی معنی‌داری را بین این دو گروه از داده‌ها نشان نداد که احتمالاً می‌تواند به دلیل تعداد کم صفات مورفولوژیک و کم بودن تعداد نشانگر مولکولی باشد.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه، SDS-PAGE، خشخاش.

مقدمه

انتشار گونه‌های مختلف تیره Papaveraceae در کره زمین دارای طیف گسترده‌ای بوده و نیمکره شمالی محل پراکنش طبیعی گونه‌های این تیره است (Mihalik, 1998). گونه‌های این تیره به احتمال زیاد بومی خاورمیانه بوده اما امروزه در مناطق گرمسیری و اروپا نیز مشاهده می‌شوند. این گیاهان در کشورهایی مانند ایران، چین، هند، ژاپن و ترکیه به‌عنوان گیاه دارویی کشت می‌شوند (Bara *et al.*, 2007). خشخاش متعلق به طبقه Magnoliophyta، رده Magnoliopsida، راسته Rununculales و تیره Papaveraceae می‌باشد. در جنس Papaver، ۱۱ زیرجنس وجود دارد (Kadereit, 1993).

Archive of SID

www.SID.ir

نگاهی به تقاضای قانونی سالیانه ۷۰۰ تن مورفین در جهان نشان می‌دهد که توجه به تولید خشخاش امری ضروریست، زیرا آلکالوئیدهای Papaver در هیچ گونه گیاهی دیگر، به‌غیر از این جنس وجود ندارد. تنها گونه‌ای که توانایی تولید مورفین به صورت تجاری را دارد، *Papaver somniferum* می‌باشد و بقیه تنها می‌توانند آلکالوئیدهای حد واسط (با توجه به این که توانایی تبدیل شدن به مورفین را در کارخانه‌های داروسازی دارند) را تولید کنند (Sariyar, 2002).

تنوع ژنتیکی اساس بیشتر برنامه‌های اصلاحی بوده و انجام گزینش منوط به وجود تنوع ژنتیکی مطلوب از نظر ویژگی‌های مورد بررسی می‌باشد (محمدی، ۱۳۸۵). مطالعه تنوع ژنتیکی فرایندی است که تفاوت یا شباهت گونه‌ها، جمعیت‌ها و یا افراد را با استفاده از روشها و مدلهای آماری خاص براساس صفات مورفولوژیک، اطلاعات شجره‌ای یا خصوصیات مولکولی افراد بیان می‌کنند (Mohammadi & Prasanna, 2003). نشانگرهای بیوشیمیایی به‌ویژه پروتئین های ذخیره‌ای بذر ازجمله نشانگرهای مولکولی هستند که برای تعیین تنوع چند شکلی آنها از تکنیک الکتروفورز استفاده می‌شود (Weising *et al*., 2005). نشانگرهای پروتئینی فرآورده نهایی ژنهای ساختاری بوده که در واقع بیانگر تنوع موجود در سطح توالی نوکلئوتیدی ژنوم هستند (عبدمیشانی و شاه نجات بوشهری، ۱۳۷۷).

الکتروفورز پروتئین‌های بذر در مطالعات شیمیوتاکسنومی کاربرد وسیعی دارد (خیامی و همکاران، ۱۳۸٤). پروتئین‌های ذخیره‌ای از پروتئین‌های غیر آنزیمی هستند و بیشتر در مراحل پُرشدن دانه در آن تجمع می‌یابند (Hajduch *et al*., 2005). روش SDS-PAGE برای خالص سازی، محاسبه مقدار نسبی و تعیین تعداد و وزن مولکولی پروتئین‌ها و پپتیدها بکار می‌رود. به همین دلیل این روش به‌عنوان پر کاربردترین روش در میان روشهای الکتروفورزی مطرح است. در عمل یک رابطه خطی بین میزان حرکت و لگاریتم وزن مولکولی پروتئین‌ها وجود دارد (مصطفائی، ۱۳۸۳).

Boulter و همکاران (۱۹٦٦) در بررسی الگوهای پروتئینی در سیستم‌های گیاهی به این نتیجه رسیدند که الگوهای پروتئینی در سیستم‌های گیاهی دارای کاربرد متفاوتی از لحاظ نوارهای پروتئینی بوده، به‌طوری که اگر نوارها دارای حرکت یکسان در داخل ژل باشند، با هم مشابهند. با فرض اینکه پروتئین‌ها محصولات مستقیم ژن هستند، هر یک از نوارها بیانگر تظاهر یک صفت می‌باشند. بنابراین تفاوت در الگوهای پروتئینی نمایانگر اختلافات ژنتیکی معنی‌دار در بین افراد جمعیت می‌باشد.

Srinivas & Narasinga Rho (۱۹۸۱) با مطالعه ترکیب های بذر ۳ واریته خشخاش زراعی گزارش کردند که واریته‌های تجاری به مراتب دارای روغن و پروتئین کمتری هستند. با الکتروفورز پروتئین به روش SDS-PAGE یک نوار بزرگ و چندین نوار کوچک مشاهده شد و با تجزیه آنها مشخص شد که پروتئین های خشخاش غنی از آسپارتیک اسید، گلوتامیک اسید و آرژنین هستند. همچنین در مطالعه دیگری بر روی پروتئین‌های با وزن مولکولی کم خشخاش زراعی با استفاده از الکتروفورز به روش SDS-PAGE نشان داده شد که این پروتئین ها

Archive of SID

www.SID.ir

شامل اسیدهای آمینه سیستئین، اسید گلوتامیک، آرژنین و مقادیر کمتری اسید آسپارتیک، لوسین، ایزولوسین، والین، هیستیدین، تریپتوفان و فنیل آلانین بودند (Srinivas & Narasinga Rho, 1987). Nessler (۱۹۹۸) با تجزیه الکتروفورزی پروتئین های بزرگ خشخاش نشان داد که این پروتئین‌ها به‌طور مرتب در لاتکس بیان می‌شوند، ازاین‌رو نشانگرهای خوبی برای توسعه شیرابه‌ها هستند.

Brezinova و همکاران (۲۰۰۹) از صفات مورفولوژیک کمی و کیفی برای بررسی تنوع ٤٠٤ ژنوتیپ خشخاش زراعی استفاده کرد. این پژوهشگران ارتفاع بوته، تعداد کپسول در هر گیاه، وزن هزاردانه، اندازه کپسول، وزن بذر در هر کپسول و وزن هر کپسول را ویژگی‌های مناسبی برای بررسی تنوع قلمداد کردند. Carolan و همکاران (۲۰۰۲) با بررسی تنوع ژنتیکی گونه‌های جنس Papaver که حاصل کشت درون شیشه‌ای بودند و استفاده از نشانگرهای AFLP گزارش کردند که گونه‌های *Papaver bracteatum*، *Papaver orientale* و *Papaver pseudo-orientale* در یک گروه و گونه‌های *Papaver somniferum* و *Papaver pseudo-orientale* هر کدام در یک گروه جداگانه قرار دارند. Shanker Acharya و Sharma (۲۰۰۹) ویژگی‌های مولکولی ژنوتیپ‌های خشخاش زراعی را با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR مورد بررسی قرار دادند. تجزیه کلاستر براساس داده‌های نشانگر RAPD ژنوتیپ‌ها را در ٤ گروه جداگانه قرار داد در حالی که تجزیه کلاستر براساس داده‌های نشانگر ISSR ژنوتیپ‌ها را در دو گروه جداگانه قرار داد. براساس داده‌های این دو نشانگر تنوع ژنتیکی پایینی در بین ژنوتیپ‌ها وجود داشت.

باتوجه به این که تاکنون گزارشی در مورد بررسی تنوع ژنتیکی گونه‌های مختلف جنس *Papaver* با استفاده از نشانگرها در ایران ارائه نشده است، این مطالعه با هدف بررسی تنوع ژنتیکی گونه‌های مختف *Papaver* با استفاده از پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه و برخی صفات مورفولوژیک انجام شد.

مواد و روشها

این مطالعه بر روی ۷ گونه از جنس *Papaver* که از مناطق مختلف استان اردبیل که در سال ۱۳۸۷ جمع‌آوری شده بود، انجام شد. شناسایی گونه‌ها از طریق ویژگی‌های گیاه‌شناسی انجام شد. بعد از شناسایی گونه‌ها موقعیت و محل جغرافیایی آنها یاداشت گردید و در مرحله رسیدگی، از نمونه‌ها بذر گرفته شد. با استفاده از بینوکولار طول ۱۰ بذر اندازه‌گیری شد و از بذرهای با کیفیت مناسب، عکس تهیه شد. مشخصات گونه‌های مورد بررسی در جدول ۱ درج شده است.

استخراج پروتئین

برای تعیین مقدار کمّی پروتئین‌ها از روش برادفورد استفاده شد. برای استخراج پروتئین ابتدا نمونه‌ها پودر شد و بعد ۱۰ میلی‌گرم از آرد نمونه در داخل میکروتیوب ریخته شد و پس از اضافه نمودن ٦٠٠ میکرولیتر بافر استخراج پروتئین (گلیسرول ۱۰٪، بتا-مرکاپتواتانول ۵٪، اوره ۵ مولار و برومو فنول بلو ۰/۱۰۰۰٪) ورتکس گردید تا پروتئین خام آن جدا شود. سپس نمونه‌ها در سانتریفیوژ با ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد (Walker, 2002).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- مشخصات جغرافیایی منطقه، ویژگی‌های گیاه‌شناسی و محل جمع‌آوری گونه‌های مختلف جنس *Papaver*

نام گونه	محل جمع‌آوری	مشخصات جغرافیایی منطقه	تعداد کروموزوم	ویژگی گیاه‌شناسی
P. bracteatum	خلخال	37/34 N, 48/36 E, h=1978m	۲n=۱٤	کپسول درشت، در انتها دارای براکته و برگها پوشیده از کرک
p. oreintale	دریاچه نئور اردبیل	37/58 N, 48/32 E, h=2498m	۲n=۲۸	کپسول متوسط، در انتها بدون براکته و برگها پوشیده از کرک
p. lasiotrix	نمین	38/18 N , 48/33 E , h=1320m	۲n=۲۸	رنگ گل نارنجی و گلبرگها جدا ازهم
p. dubium	پارس‌آباد	39/37 N, 47/55 E, h=56m	۲n=۱٤	چهار خال سیاه در انتهای گلها و برگها کرک‌دار
p. rhoeas	گرمی	39/00 N, 48/05 E, h=997m	۲n=۱٤	گل رزی شکل، برگها بدون کرک و دارای دوخال کوچک در طرفین
p. argemone	مشکین شهر	38/32 N, 47/50 E, 1120m	۲n=۱٤	کپسول خاردار و خال سیاه یا آبی در بالای کپسول
p. somniferum	گونه زراعی	–	۲n=۲۲	گلها درشت و رنگ آن سفید یا قرمز مایل به بنفش

الکتروفورز نمونه‌ها

برای الکتروفورز نمونه‌ها مقدار ۱۰ میکرولیتر از نمونه‌ها با سرنگ هامیلتون به داخل ژل بالایی (ژل ۱۲٪) تزریق شد. تانک به ولتاژ ۵۰ ولت وصل گردید و پس از ورود نمونه‌ها به ژل پایینی (ژل ۵٪)، ولتاژ به ۱۰۰ ولت تغییر داده شد. بعد از رسیدن نمونه‌ها به پایین ژل ولتاژ قطع و ژل جدا گردید (Walker, 2002).

رنگ‌آمیزی

ژل در داخل محلول رنگ کماسی برلیانت بلو (G-250) به مدت یک ساعت قرار داده شد. سپس ژل به محلول رنگ‌بَر به مدت یک شب برای ظهور و تثبیت باندها منتقل گردید.

حرکت نسبی (Rf) نوارها از روی تصویر ژل و طبق فرمول زیر تعیین کرد:

Rf= مسافت طی شده توسط رنگ نشانگر/ مسافتی که هر نوار پروتئینی طی کرده

با توجه به اطلاعات مربوط به وزن نشانگرهای مولکولی (۷۸، ٦۳، ٤٥، ۲۳، ۱۸، ۱٤ و ٤ کیلو دالتون) و Rf پروتئین‌های استاندارد، منحنی استاندارد روی کاغذ نیمه لگاریتمی ترسیم شد. محور این منحنی به اوزان مولکولی اختصاص داشت. وزن مولکولی پروتئین‌های مورد مطالعه از روی منحنی استاندارد محاسبه شد. برای تعیین وزن مولکولی پروتئین‌ها در ژلهای دارای شیب غلظت (خطی یا غیرخطی) اکریل آمید از فرمول Log10 Mr= a Log10T'+b استفاده شد. در این فرمول T'، a و b به‌ترتیب، غلظت اکریل آمید در محل نوار پروتئینی، شیب خط استاندارد و محل تلاقی خط استاندارد با محور y می‌باشد (مصطفائی، ۱۳۸۳).

تجزیه و تحلیل‌های آماری داده‌ها

الگوهای نواربندی به صورت صفر و یک امتیازدهی شدند. با استفاده از ضریب تشابه جاکارد، ماتریس تشابه

Archive of SID

www.SID.ir

تشکیل شد. پس از بررسی روشهای مختلف تجزیه خوشه‌ای (کلاستر)، CLINK (CL) به‌عنوان مناسبترین روش این تجزیه انتخاب و انجام شد. تجزیه به مؤلفه‌های هماهنگ اصلی نیز براساس ماتریس تشابه جاکارد صورت گرفت. این تجزیه‌ها توسط نرم‌افزار NTSYS انجام شدند. تجزیه خوشه‌ای برای صفات مورفولوژیک براساس روش وارد (پس از بررسی تمام روشها) در نرم‌افزار SPSS 16 انجام شد. آزمون مانتل براساس ماتریس تشابه جاکارد برای هر دو داده‌های مورفولوژیک و پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه با نرم‌افزار XLSTAT 2011 انجام شد.

نتایج

با توجه به اطلاعات حاصل از امتیازدهی نوارهای پروتئینی، در مجموع در هفت گونه *Papaver* مورد بررسی ۲۰ مکان یا نوار پروتئینی شناسایی شد (شکل ۱)، که بیشترین تعداد نوار مربوط به گونه‌های *P. rhoeas* و *P. bracteatum* با ۱۷ نوار و کمترین تعداد نوار مربوط به گونه‌های *P. argemone* و *P. somniferum* با ۱۳ نوار پروتئینی بود. آنالیز نوارها براساس الکتروفورز، پروتئین های بزرگ و کوچکی را با وزن مولکولی مشخص شناسایی کرد. پروتئین‌های بزرگ (major proteins) دارای نوارهای پُررنگ‌تر و مشخص‌تر هستند و در مکانهای ۸، ۹، ۱۱، ۱۲،۱۵ و ۱۶ دیده می‌شوند. نوارهای پروتئینی کوچک (minor proteins) در بقیه مکانهای ژل پراکنده بوده و اندازه آنها در جدول ۲ درج شده است. بررسی مقدار کمّی پروتئین گونه‌های مختلف *Papaver* نشان داد که بیشترین مقدار پروتئین مربوط به *P. dubium* و *P. rhoeas* است که از لحاظ تعداد نوار پروتئینی به‌ترتیب ۱۶ و ۱۷ نوار بیشترین نوار پروتئینی را دارا بودند. گونه‌های *P. argemone* و *p. somniferum* کمترین مقدار و کمترین تعداد نوارهای پروتئینی (۱۳ نوار) را داشتند (جدول ۳).

تجزیه خوشه‌ای براساس ماتریس ضرایب تشابه جاکارد حاصل از داده‌های صفر و یک نوارهای پروتئینی گونه‌های مورد بررسی را در ٤ گروه جداگانه قرار داد. در گروه اول *P. somniferum*، گروه دوم *P. oreintale*، *P.bracteatum*، *P. lasiotrix* و *P. rhoeas*، گروه سوم *P. dubium* و در گروه چهارم *P. argemone* قرار گرفت (شکل ۳). نتایج تجزیه به مؤلفه‌های هماهنگ اصلی (PCA) براساس ماتریس تشابه جاکارد نیز گونه‌ها را در ٤ گروه جداگانه قرار داد که با نتایج تجزیه خوشه‌ای مطابقت کامل داشت (شکل ٤). بررسی ماتریس تشابه جاکارد نشان می‌دهد که بیشترین شباهت در گروه دوم مابین گونه *P. bracteatum* و *P. orientale* با ضریب ۰/۹٤ و کمترین شباهت مربوط به گونه‌های *P. rhoeas* و *P. argemone* با ضریب ۰/۵۰ شباهت بود (جدول ۳).

بررسی صفات مورفولوژیک مانند اندازه طول بذر، ارتفاع گیاه، رنگ بذر، رنگ گل و مقدار پروتئین نشان‌دهنده تنوع خوبی بین گونه‌های مورد بررسی بود (جدول ۳، شکل ۷). بنابراین از این صفات می‌توان به‌عنوان شاخص گیاه‌شناسی برای شناسایی ظاهری گونه‌های این جنس استفاده کرد. تجزیه خوشه‌ای براساس روش وارد و با استفاده از مربع فاصله اقلیدسی و با در نظر گرفتن صفات مورفولوژیک انجام شد. گونه‌های مورد بررسی در سه گروه جداگانه قرار

Archive of SID

www.SID.ir

گرفتند. گونه‌های *P. bracteatum*، *P. orientale*، *P. somniferum*، *P. argemone* و *P. lasiotrix* در گروه اول؛ *P. dubium* در گروه دوم و *P. rhoeas* در گروه سوم قرار گرفت (شکل ۵).

آزمون مانتل برای تعیین ارتباط بین داده‌های مورفولوژیک و پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه انجام شد (شکل ٦). این آزمون همبستگی معنی‌داری را بین این دو گروه از داده‌ها نشان نداد (r= ۰/۱٦۱).

جدول ۲- تنوع نوارهای پروتئینی بذر گونه‌های مختلف *Papaver* به همراه وزن مولکولی تقریبی بر حسب کیلو دالتون و حرکت نسبی آنها

(اعداد یک و صفر به‌ترتیب بیانگر وجود و عدم وجود یک نوار پروتئینی خاص است)

نوار	Rf	وزن مولکولی	*P. somniferum*	*P. argemone*	*P. dubium*	*P. bracteatum*	*P. oreintale*	*P. rhoeas*	*P. lasiotrix*
۱	۰/۱۲	۹۸/۲۲	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰
۲	۰/۱۵	۸۸/۱٤	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۳	۰/۲۰	۷۳/٤۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
٤	۰/۲۵	٦۱/۸٤	۱	۰	۰	۱	۱	۱	۱
۵	۰/۲۹	۵٤/۰۲	۱	۰	۰	۰	۰	۱	۱
٦	۰/۳۱	۵۱/۷۷	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۰
۷	۰/۳۲	٤۹/٦۹	۱	۰	۰	۱	۱	۱	۱
۸	۰/۳۵	٤۵/۹۷	۰	۱	۱	۰	۰	۰	۰
۹	۰/۳۸	٤۳/۵٤	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۱۰	۰/٤٤	۳۷/٦٦	۰	۰	۱	۱	۱	۱	۰
۱۱	۰/۵٤	۳۱/٤۲	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۱۲	۰/۵۷	۳۰/۰۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۱۳	۰/٦۰	۲۸/٦۸	۰	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۱٤	۰/٦۹	۲٤/۹٦	۰	۰	۱	۱	۰	۱	۱
۱۵	۰/۷۳	۲۳/٤۲	۰	۰	۱	۱	۱	۱	۱
۱٦	۰/۷۹	۲۰/۹۲	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۱۷	۰/۸٤	۱۸/۷۲	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۱۸	۰/۸۷	۱۷/٤۸	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۱۹	۰/۹۱	۱۵/۷۱	۱	۰	۱	۱	۱	۱	۱
۲۰	۰/۹٦	۱٤/۱٤	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۱

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۳- مقدار پروتئین‌های بذر (بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به همراه میانگین طول بذر، ارتفاع، رنگ گل و رنگ بذر گونه‌های مختلف *Papaver*

نام گونه	طول بذر (میکرومتر)	رنگ بذر	رنگ گل	میانگین ارتفاع گیاه (سانتی‌متر)	مقدار پروتئین (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)
P. rhoease	۲۹۹± ۱۹/۸۷	قهوه‌ای پررنگ	قرمز	٤٨	۸۳٤/٥
P. bracteatum	۹۹٦±۲۱/۸۳	قهوه‌ای روشن	نارنجی	۱۱٥	۷۰٥
P. argemone	۸۳۰±۱۸/۹۹	قهوه‌ای تیره	قرمز کم‌رنگ	۳٦	٦۰٤/٥
P. lasiotrix	۷۰۰/۵ ±۱۵/۵۳	قهوه‌ای روشن	نارنجی	٤۳	٦۸۰
P. dubium	۸۷۰/۵±۱۷/۷۰	قهوه‌ای کرمی	قرمز	٥۲	۱۰۷۱
P. somniferum	۱۰۳٥±۱۹/٤۳	سفید	بنفش	–	٥۳۸/٥
P. orientale	۹۹۹/۵±۱۷/۰۷	قهوه‌ای	نارنجی	۱۰٦	٥۷۲

جدول ٤- ماتریس ضرایب تشابه جاکارد گونه‌های مختلف *Papaver*

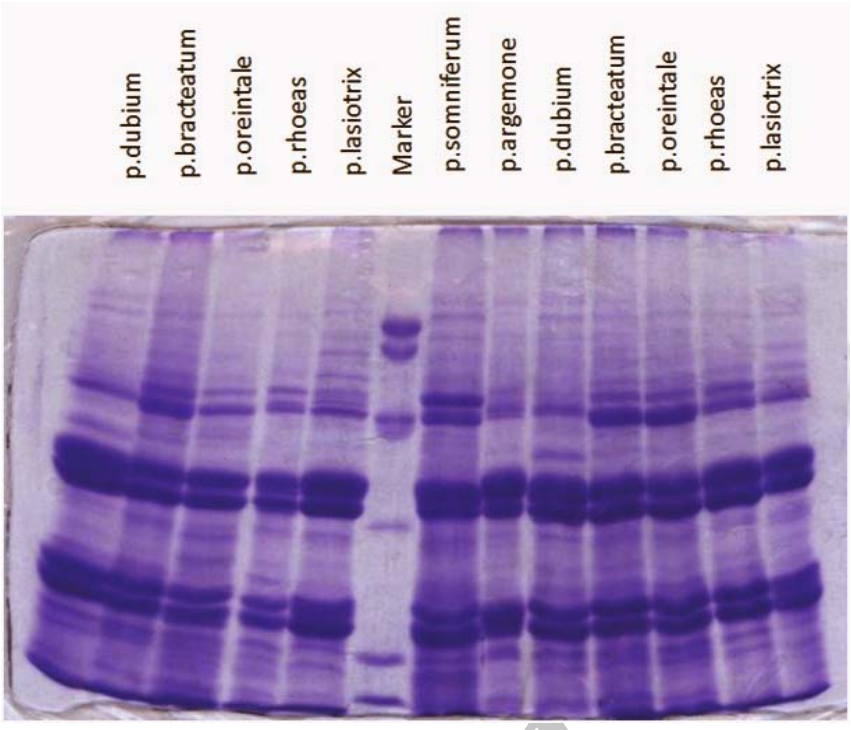
نام گونه	*p. somniferum*	*p. argemone*	*p. dubium*	*p. bracteatum*	*p. oriental*	*p. rhoeas*	*p. lasiotrix*
p. somniferum	۱						
p. argemone	۰/٥۲۹	۱					
p. dubium	۰/٥۲٦	۰/۷۰٥	۱				
p. bracteatum	۰/٦٦۷	۰/٥۷۸	۰/۸۳۳	۱			
p. oriental	۰/۷۰٥	۰/٦۱۱	۰/۷۷۸	۰/۹٤۱	۱		
p. rhoeas	۰/۷٦٤	۰/٥۰	۰/۷۳٦	۰/۸۸۸	۰/۸۳۳	۱	
p. lasiotrix	۰/۷۰٥	۰/٥۲٦	۰/٦۸٤	۰/۸۳۳	۰/۷۷۸	۰/۸۳۳	۱

بحث

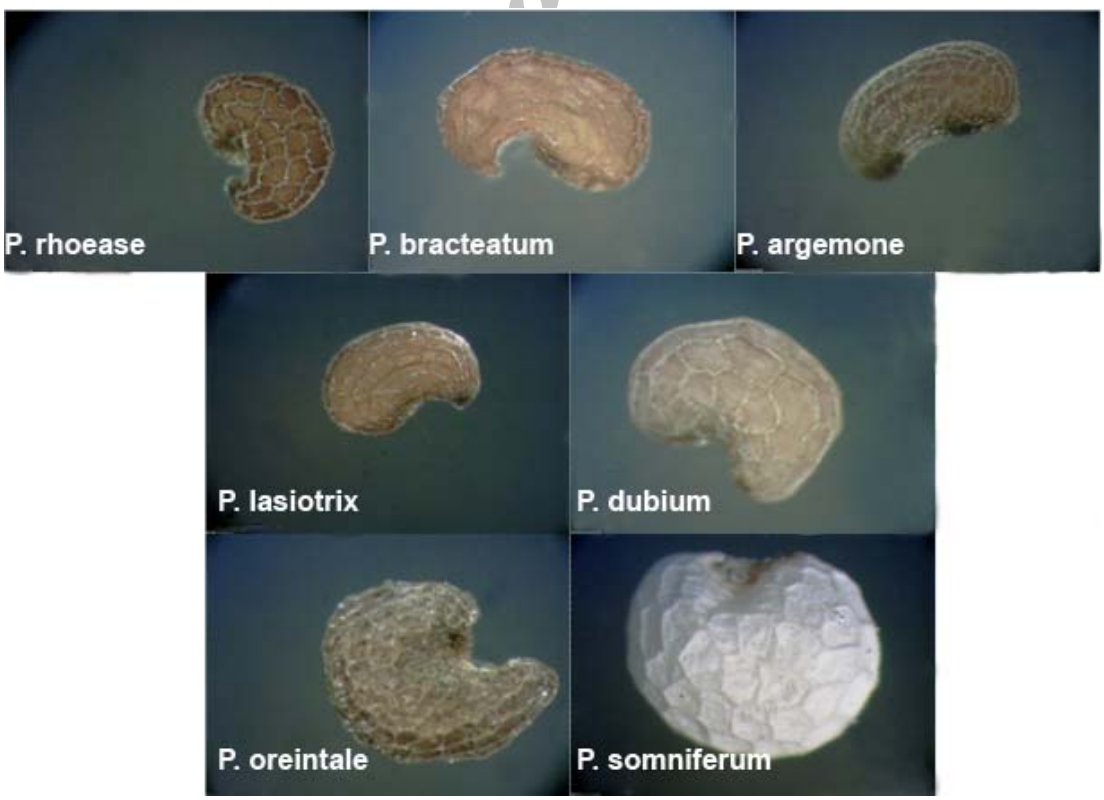
مطابق بودن نتایج تجزیه خوشه‌ای با نتایج تجزیه به مؤلفه‌های هماهنگ اصلی نشان می‌دهد که گروه‌بندی درست انجام شده است. تجزیه خوشه‌ای براساس پروتئین های ذخیره‌ای دانه تا حد زیادی با تقسیم‌بندی Mihalik (۱۹۹۸) براساس ویژگی‌های گیاه‌شناسی و Carolan و همکاران (۲۰۰٦) براساس توالی DNA مطابقت داشت. در تقسیم‌بندی گیاه‌شناسی گونه *P. somniferum* در بخش *Papaver*، گونه *P. lasiotrix* در بخش *Oxytona*، گونه‌های *P. rhoeas* و *P. dubium* در بخش *Rhoeadium* و گونه *P. argemone* در بخش *Argemonidium* قرار دارد. اما طبقه‌بندی براساس پروتئین‌های ذخیره‌ای *P. rhoeas* را در گروه دوم با گونه‌های بخش Oxytona قرار داد. با تجزیه خوشه‌ای براساس صفات مورفولوژیک، گونه‌ها در سه گروه جداگانه قرار گرفتند. این گروه‌بندی با نتایج تجزیه خوشه‌ای براساس پروتئین های ذخیره‌ای دانه مشابهت کمی داشت که از آن جمله می‌توان به قرار گرفتن گونه‌های *P. oreintale* و *P. bracteatum* در یک گروه اشاره کرد.

Archive of SID

www.SID.ir

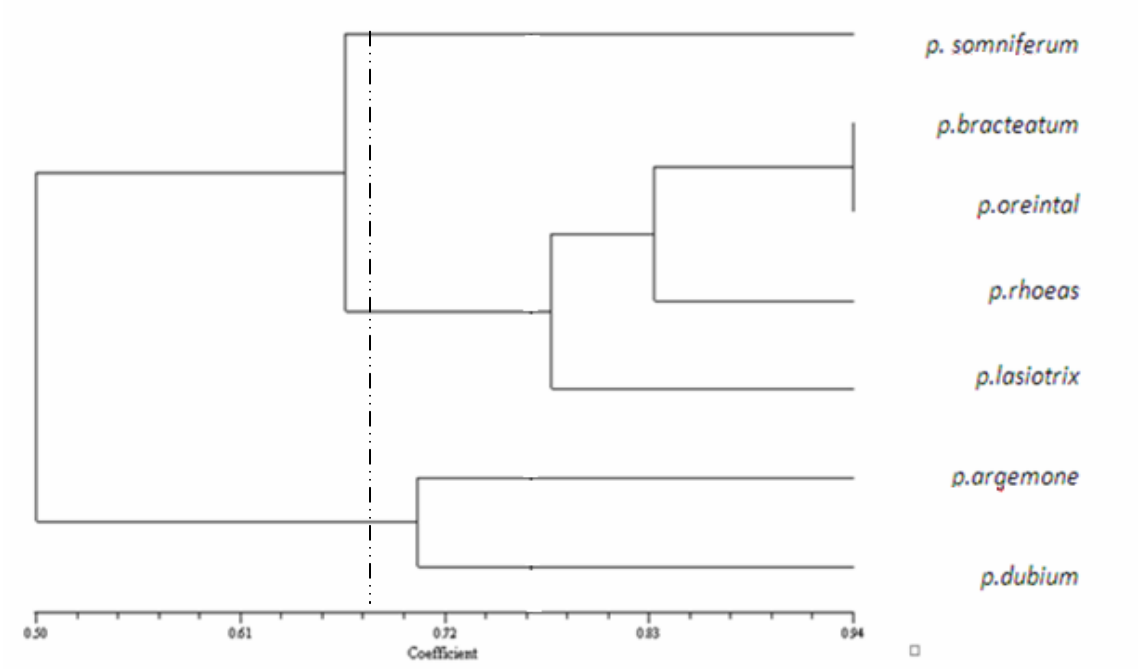


شکل ۱- مقایسه نوارهای پروتئینی حاصل از الکتروفورز پروتئین‌ها به روش SDS-PAGE در بذر گونه‌های مختلف *Papaver*

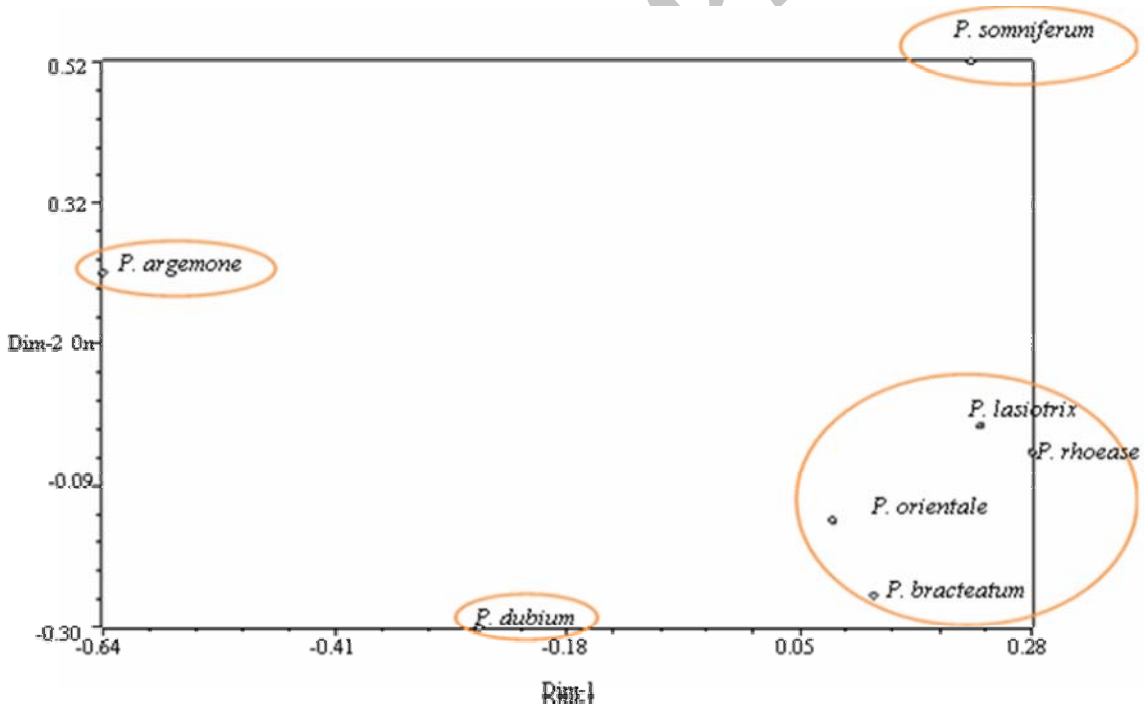


شکل ۲- شکل‌های مختلف بذر گونه‌های مختلف *papaver* مورد مطالعه با بزرگنمایی یکسان

www.SID.ir

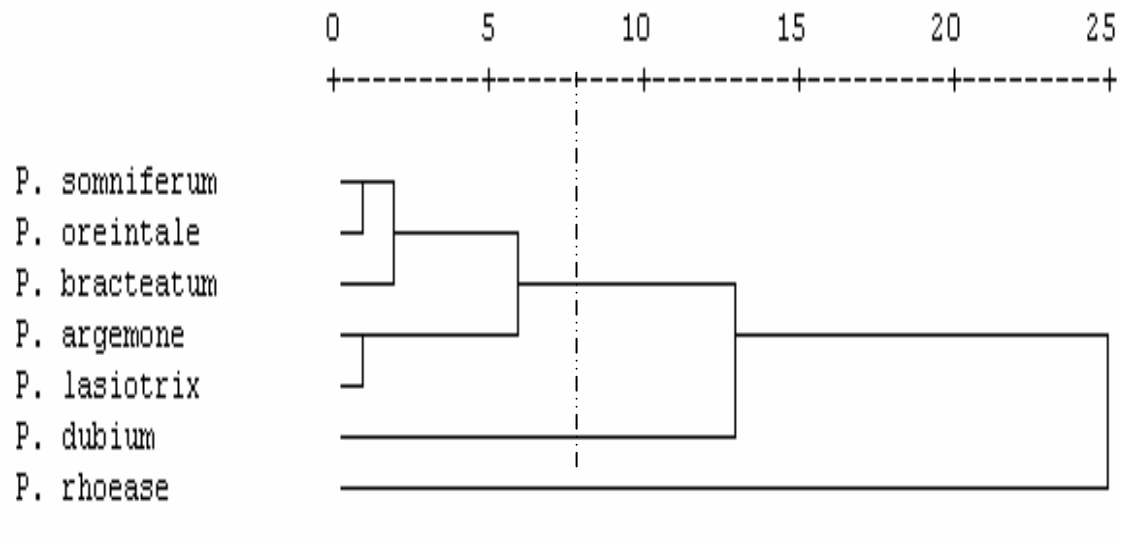


شکل ۳- دندروگرام تجزیه خوشه‌ای براساس تجزیه کامل حاصل از تشابه جاکارد پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر گونه‌های مختلف *Papaver*

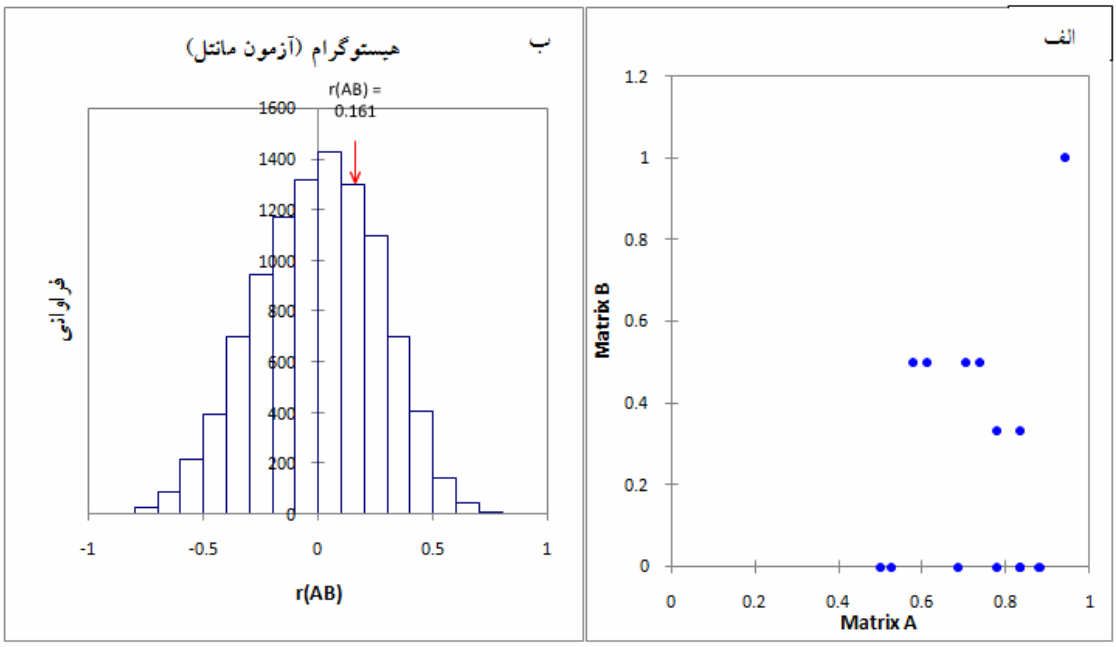


شکل ٤- نمودار دو بعدی حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های هماهنگ اصلی گونه‌های مختلف *Papaver*

www.SID.ir



شکل ۵- دندروگرام تجزیه خوشه‌ای به روش وارد و با استفاده از مربع فاصله اقلیدسی حاصل از صفات مورفولوژیک گونه‌های مختلف ***Papaver***



شکل ٦- الف) نمایش همبستگی ماتریس‌های حاصل از تشابه جاکارد بین داده‌های مورفولوژیک و پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه، ب) هیستوگرام حاصل از آزمون مانتل بین داده‌های مورفولوژیک و پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه گونه‌های مختلف ***Papaver***

www.SID.ir

شکل ۷- ویژگی‌های مورفولوژیکی (شکل کپسول، شکل و رنگ گل) گونه‌های *Papaver* مورد مطالعه

نداشتن همبستگی معنی‌دار براساس آزمون مانتل بین صفات مورفولوژیک مورد بررسی در این آزمایش با داده‌های مولکولی حاصل از پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه احتمالاً می‌تواند به دلیل تعداد کم صفات مورفولوژیک و کم بودن تعداد نشانگر مولکولی (کم بودن تعداد باندهای پروتئینی که از معایب مهم نشانگرهای بیوشیمیایی است) باشد. نداشتن همبستگی معنی‌دار بین دو گروه از ویژگی‌ها مورد نادری نیست. Esmaeilzadeh Moghaddam و همکاران (۲۰۰۵) در گندم بین داده‌های زراعی با نشانگر AFLP و García و همکاران (۲۰۰۷) در ۸ جمعیت بومی پاسپالوم در آرژانتین بین داده‌های حاصل از صفات کمّی و نشانگر RAPD همبستگی معنی‌داری را با آزمون مانتل گزارش نکردند.

از ماتریس تشابه جاکارد بدست آمده از داده‌های پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه می‌توان در برنامه‌های اصلاحی این گیاه با ارزش سود جست، به‌عنوان مثال تلاقی بین گونه‌ای *P. somniferum* با *P. dubium* و *P.argemone* با ۰/۵۲۶٪ و ۰/۵۲۹٪ تشابه ممکن است به دلیل هتروزیس گونه‌ای تولید شود که دارای آلکالوئیدهای مفید بیشتری به غیر از مورفین باشد که بتوان جایگزین گونه زراعی آن شود.

Archive

www.SID.ir

نکته مهم دیگری که می‌توان به آن اشاره کرد این است که با توجه به نتایج ماتریس تشابه جاکارد بالایی که از داده‌های پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه بین گونه‌های *P. bracteatum* و *P. orientale* (با تشابه بالای ۰/۹٤) بدست آمد. مطالعات نشان داده است که تلاقی این دو گونه در طبیعت براحتی امکان‌پذیر می‌باشد و بیشتر محققان گونه *Papaver Pseudo- orientale* را با توجه به تعداد کروموزوم‌هایش (2n=42) و تلاقی آلوپلی‌پلوئیدی حاصل تلاقی این دو گونه می‌دانند (Goldblatt, 1974؛ Ojala *et al.*, 1990). نتیجه مهمی که می‌توان از این نکته استنباط کرد این است که تلاقی بین گونه‌ای در جنس *Papaver* براحتی امکان‌پذیر است و کارهای بیشتر اصلاحی روی این جنس، احتمالاً منجر به تولید گونه جدیدی شود که مثلاً آلکالوئیدهایی مانند تبائین و کدئین بالایی تولید کند که داروهای باارزشی در داروسازی می‌باشند.

سپاسگزاری

از جناب آقای دکتر علی مصطفائی، رئیس بخش مطالعات بیولوژی دانشکده داروسازی علوم پزشکی به دلیل راهنماییهای ارزنده ایشان و در اختیار قرار دادن آزمایشگاه برای انجام این تحقیق سپاسگزاری می‌شود.

منابع مورد استفاده

– خیامی، م.، حیدری، ر. و ریگازاده، ط.، ۱۳۸٤. رده‌بندی چند رقم کانولا بر مبنای پروتئین کل و ذخیره و اسیدهای چرب دانه. مجله علوم کشاورزی ایران، ۳٦(۵): ۱۲۱٤–۱۲۰۷.

– عبدمیشانی،س. و شاه نجات بوشهری، ع.ا.، ۱۳۷۷. اصلاح نباتات. جلد دوم، مؤسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران، ۳۵۲ صفحه.

– محمدی، س.ا.، ۱۳۸۵. تجزیه و تحلیل داده‌های مولکولی از دیده‌گاه بررسی تنوع ژنتیکی. مقالات کلیدی نهمین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران، ۷–۵ شهریورماه: ۱۱۹–۹٦.

– مصطفائی، ع.، ۱۳۸۳. راهنمای نظری و عملی الکتروفورز پروتئین در ژل. انتشارات یادآوران، چاپ دوم، ۱۸٤ صفحه.

- Bara, I., Bara, C., Capraru, G. and Truta, E., 2007. The possible ways of specification in Papaveraceae family. Analele Ştiinţifice ale Universităţii, Alexandru Ioan Cuza", Secţiunea Genetică şi Biologie Moleculară, Tom VIII: 223-233.
- Boulter, D., Thurman, A. and Turner, B.L., 1966. The use of Disc electrophoresis of plant proteins in systematics. Taxon, 15: 135-142.
- Brezinova, B., Macak, M. and Eftimova, J., 2009. The Morphological Diversity of Selected Traits Of World Collection Of Poppy Genotypes (Genus *Papaver*). Journal of Central European Agriculture, 2: 183-190.
- Carolan, J.C., Hook, I.L.I., Mark, CH.W., Kadereit, J.W. and Hodkinson, T.R., 2006. Phylogenetics of *Papaver* and Related genera based on DNA sequences from ITS nuclear ribosomal DNA and plastid trnL Intron and trnL–F intergenic spacers. Annals of Botany, 98: 141-155.
- Carolan, J.C., Hook, I.L.I., Walsh, J.J. and Hodkinson, T.R., 2002. Using AFLP markers for species differentiation and assessment of genetic variability of in vitro-Cultured *Papaver bracteatum* (section oxytona). In vitro cellular & developmental biology-Plant, 38: 300-307.
- Esmaeilzadeh Moghaddam, M., Thretowan, R.M., William, H.M., Rezai, A., Arzani, A. and Mirlohi, A.F., 2005. Assessment of genetic diversity in bread wheat genotypes for tolerance to drought using AFLPs and agronomic traits. Euphytica, 141: 147-156.
- García, M.V., Balatti, P.A. and Arturi, M.J., 2007. Genetic variability in natural populations of Paspalum dilatatum Poir. Analyzed by means of morphological traits and molecular markers. Genetic Resources and Crop Evolution, 54: 935-946.
- Goldblatt, P., 1974. Biosystematic studies in *Papaver* section Oxytona. Annals of the Missouri Botanical Garden, 61: 264-296.
- Hajduch, M., Ganapathy, A., Stein, J.W. and Thelen, J.J., 2005. A systematic proteomic study of seed filling in soybean. Establishment of high-resolution two-dimensional reference maps, expression profiles, and an interactive proteome database. Plant Physiology, 137: 1397-1419.
- Kadereit, J.W., 1993. Papaveraceae. 20-33, In: Kubitzki, K., Rohwer, J G. and Bittrich, V. (eds),

Archive of SID

www.SID.ir

The Families and Genera of Vascular Plants. Springer-Verlag, 478p.
- Mihalik, E., 1998. Biology of poppy. 1. Taxonomy. 7-47, In: Bernath, J. (ed.), Poppy: the genus *Papaver*. Harwood Academic Publishers, 352p.
- Mohammadi, S.A. and Prasanna, B.M., 2003. Analysis of genetic diversity in crop plants- Salient statistical tools and considerations. Crop Science, 43: 1235-1248.
- Nessler, C.L., 1998. In vitro culture technologies. 209-218, In: Poppy: The Genus *Papaver*. Bernath, J., ed. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands, 352p.
- Ojala, A., Rousi, A., Lewing, E., Pyysalo, H. and Widen, C.j., 1990. Interspecific hybridization in *Papaver* ш. F1 hybrids between species of section Oxytona. Hereditas, 112: 221-230.
- Sariyar, G., 2002. Biodiversity in the alkaloids of Turkish *Papaver* Species. Pure and Applied Chemistry, 4: 557-574.
- Shanker Acharya, H. and Sharma V., 2009. Molecular characterization of Opium Poppy (*Papaver somniferum*) germplasm. American Journal of Infectious Diseases, 5(2): 148-153.
- Srinivas, H. and Narasinga Rho, M.S., 1981. Studies on the proteins of poppy seed (*Papaver somniferum* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 29: 13-25.
- Srinivas, H. and Narasinga Rho, M.S., 1987. Studies on the low molecular weight proteins of Poppy seed (*Papaver somniferum* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 35: 12-14.
- Walker, J.M., 2002. The Protein Protocols Handbook. Humana Press Inc., Totowa, 1146p.
- Weising, K., Nybom, H., Wolff, K. and Kahl, G., 2005. DNA Fingerprinting in Plants Principles, Methods, and Applications Second Edition. Taylor & Francis Group, 444p.

Archive of SID

www.SID.ir

Evaluation of diversity seed storage proteins and some morphological traits in various species of Papaver

R. Ashrafi[1], A. Najaphy[2*], M. Shaban[1] and M. Fathi[3]

1- MSc. Student, Plant Breeding Department, Razi University, Kermanshah, Iran
2*- Corresponding author, Plant Breeding Department, Razi University, Kermanshah, Iran
E-mail: nadjaphy@yahoo.com
3- Agricultural Support System Company, Ardabil, Iran

Received: November 2010 Revised: May 2011 Accepted: May 2011

Abstract

This experiment was conducted to evaluate the seed storage protein of seven different species of Papaver in Ardabil Province, Iran by SDS-PAGE method. By scoring banding patterns data, a total of 20 loci were identified in the species. Maximum number of protein band (17 bands) was belonged to *P. bracteatum* and *P. rhoease*. Minimum number of protein band (13 bands) was related to the species of *P. argemone and P. somniferum*. Cluster analysis based on Jaccard's similarity matrix classified different species in four groups. Different species of papaver were classified as follows: *P. somniferum* in the first group, *P. orientale*, *P. bracteatum*, *P. lasiotrix* and *P. rhoease* in the second group, *P. dubium* in the third group and *P. argemone* in the fourth group. Different species showed a good variety with regard to the morphological traits (petal color and shape, seed color and size and plant height) and the species were classified in three separate groups based upon cluster analysis. Mantel test was performed to examine the correlation of morphological data with seed storage proteins. This test did not show significant correlation between these two groups of data possibly due to the low number of morphological traits and low number of molecular markers.

Key words: Genetic diversity, seed storage proteins, SDS-PAGE, Papaver.

Archive of SID

www.SID.ir