دو فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۱، شمارهٔ ۱، صفحهٔ ۱۶۱-۱۵۰ (۱۳۹۲)

بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های اسپرس زراعی (*Onobrychis sativa*) توسط پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر و بررسی ارتباط آن با عوامل اکولوژیکی

پروین صالحی شانجانی[1*]، مهناز قره‌چائی[2]، علی‌اشرف جعفری[3] و غلامرضا بخشی خانیکی[4]

۱*- نویسنده مسئول مکاتبات، استادیار، بانک ژن منابع طبیعی ایران، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران
پست‌الکترونیک: Psalehi@rifr-ac.ir

۲- کارشناس‌ارشد، بیوتکنولوژی، دانشگاه پیام نور کرج، مرکز تهران

۳- استاد، بانک ژن منابع طبیعی ایران، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران

٤- استاد، دانشگاه پیام نور کرج، تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۱/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۰۳/۲۹

چکیده

اسپرس (*Onobrychis sativa*) از لگوم‌های علوفه‌ای مهم در مراتع ایران است. بدلیل زمان‌بر بودن فرایند اصلاح آن، استفاده از ارقام جدید اساساً محدود به واردات ارقام خارجی می‌شود. در این تحقیق الگوی پروتئینی ۱۱۰ ژنوتیپ از ۱۱ جمعیت برای تعیین میزان تنوع ژنتیکی مورد بررسی قرار گرفت. براساس نتایج SDS-PAGE، ٤٦ باند قابل تکثیر، پپتید پروتئینی، برای مطالعه تنوع ژنتیکی ثبت گردید. نسبت تعداد باندهای پلی‌مورف نسبت به تعداد کل باندها از ۰/۱۸۲ تا ۰/۲۸٤ با میانگین ۰/۲۳۳ متغیر بود. SDS-PAGE پروتئین‌های بذر تنوع درون و میان جمعیتی بالایی را نشان دادند که تمایز مشخصی بر اساس منشأ و رویشگاه نشان ندادند. همبستگی بین ماتریس فاصله‌های ژنتیکی و جغرافیایی به وسیله آزمون مانتل ثابت نشد و ضریب همبستگی بین آنها از نظر آماری معنی‌دار نگردید. این مسئله نیز نشان‌دهنده عدم وجود شیب محیطی در گوناگونی پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر است. بنابراین در برنامه‌های اصلاحی اسپرس باید تنوع ژنتیکی ارقام اسپرس با استفاده از والدین مختلف افزایش یابد. افزایش اساس ژنتیکی برای اصلاح اسپرس می‌تواند بوسیله کاربرد سیستماتیکی ژرم‌پلاسم که الگوی پروتئینی متفاوتی داشته و ویژگی‌های کمی بهتری دارند حاصل شود.

واژه‌های کلیدی: *Onobrychis Sativa*، تنوع ژنتیکی، پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر، عوامل اکولوژیکی.

مقدمه

اسپرس (*Onobrychis*) از جنس‌های با ارزش مرتعی و علوفه‌ای است که از نواحی مدیترانه‌ای تا آسیای مرکزی گسترش دارد. بسیاری از گونه‌های اسپرس محدود به نواحی شمال غربی آسیا بخصوص ایران و ترکیه بوده، به‌طوری‌که این نواحی مرکز اصلی تنوع ژنتیکی این جنس محسوب می‌شوند. بسیاری از گونه‌های اسپرس دارای پروتئین بالایی بوده، بنابراین نقش مهمی در تعلیف دام، غنی‌سازی خاک و افزایش ارزش غذایی مراتع مقاوم به خشکی دارند (Emre *et al.*, 2007).

Archive of SID

www.SID.ir

اسپرس زراعی (*Onobrychis sativa* L.) یکی از گیاهان مقاوم به تنش‌های حیاتی و غیر حیاتی می‌باشد و نقش مهمی در تولید علوفه در مراتع ایران دارد. دستیابی به ارقام سازگار و پرمحصول برای مناطق مختلف کشور یکی از راههای جبران کمبود علوفه است. این گیاه دارای ریشه‌های طویل، ضخیم، قوی، خشبی و مستقیم و از گونه‌های خوشخوراک، پرتولید، مقاوم به خشکی و سازگار در انواع خاکهای کم عمق و سنگلاخی می‌باشد. اسپرس در برخی مناطق کشور به صورت زراعی کشت می‌شود و در مراتع مناطق استپی و نیمه استپی کشور بطور طبیعی می‌روید (Karimi., 1990). ارزش غذایی اسپرس بیشتر از یونجه است و سازگاری آن در خاک‌های مختلف بیشتر از یونجه بوده و بعلاوه نگهداری آن هزینه کمتری دارد. اسپرس گیاه مناسبی برای مراتع به شمار می‌آید، زیرا در اثر چرای مستقیم دام ایجاد نفخ نمی‌کند که این یک مزیت عمده در مقایسه با سایر گیاهان علوفه‌ای ازجمله یونجه است (Hasani., 2004). بنابراین، حفظ ذخایر ژنتیکی و کاربرد علمی و صحیح از این منبع ژنتیکی باعث احیا مراتع و افزایش تولید علوفه کشور می‌گردد.

حفاظت و شناخت منابع با ارزش گیاهی برای اصلاح و تولید ارقام پرمحصول مهمترین هدفی است که دانشمندان بسیاری را ترغیب به پژوهش بر روی منابع ژنتیکی می‌کند. تنوع در ژرم‌پلاسم، پایه و اساس اصلاح گیاهیست. عدم شناخت ویژگی‌های زراعی، زیستی و بیوشیمیایی، کاربرد ژرم‌پلاسم را محدود می‌کند. عدم استفاده از ژرم‌پلاسم برای اصلاح گیاهان زراعی به معنی اتلاف منابع است (Ghafoor & Arshad., 2008). اساس برنامه‌های اصلاح ژرم‌پلاسم، شناخت تنوع ژنتیکی آن است. میزان تنوع ژنتیکی ژرم‌پلاسم بوسیله ویژگی‌های مورفولوژیکی و مارکرهای ژنتیکی اندازه‌گیری می‌شود. ژرم‌پلاسمی که تنوع ژنتیکی آن بررسی شده است، ماده اولیه مناسبی برای استفاده در برنامه‌های دورگ‌گیری است (Ghafoor *et al.*, 2002). تکنیک‌های مولکولی ابزار مهمی برای بررسی تنوع ژنتیکی می‌باشند. از میان آنها مارکرهای مولکولی پروتئینی، سدیم دودسیل سولفات پلی‌اکریل‌آمید ژل الکتروفورز (SDS-PAGE)، در مقایسه با مارکرهای مولکولی DNA بسیار ارزان هستند. مارکرهای مولکولی پروتئینی به علت اعتبار و سهولت در تشریح ساختار ژنتیکی ژرم‌پلاسم گیاهان زراعی کاربرد بسیاری دارد. ولی کاربرد آن به علت پلی‌مورفیسم پایین در لگوم‌ها اساساً محدود به گندمیان می‌شود (Ghafoor *et al.*, 2002). پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر به‌عنوان مارکرهای ژنتیکی برای حل مسائل تاکسنومیکی و تکاملی گیاهان زراعی بسیاری استفاده شده است (Ladizinsky & Hymowitz., 1979; Das & Mukarjee., 1995). پژوهشگران می‌توانند بوسیله اطلاعات حاصل از پروتئین‌های ذخیره‌ای ژنوتیپ‌های برتر را انتخاب کنند تا از آنها به‌عنوان والدین برای هیبریداسیون و معرفی ارقام جدید استفاده شود. با توجه به کارایی بالا و هزینه پایین این روش و نیز انتشار برخی پژوهش‌ها از کارایی این روش در مطالعه بین‌گونه‌ای اسپرس (Emre *et al.*, 2007) و درون‌گونه‌ای برخی گیاهان لگومینه (*Pisum sativum* L.، Ghafoor & Arshad., 2008) تصمیم به استفاده از آن برای مطالعه تنوع ژنتیکی برخی جمعیت‌های اسپرس نمودیم. بنابراین هدف از این تحقیق شناسایی تنوع ژنتیکی و پلی‌مورفیسم درون گونه‌ای اسپرس زراعی براساس پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر، شناسایی عوامل اکولوژیکی مرتبط با تنوع ژنتیکی حاصل از الگوی پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر و معرفی جمعیت‌هایی برای تلاقی که ممکن است بالاترین میزان هتروزیس را داشته باشند.

Archive of SID

www.SID.ir

مواد و روش‌ها

یازده جمعیت اسپرس موجود در بانک ژن منابع طبیعی برای مطالعه پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر انتخاب شدند. جدول ۱ منشأ و مشخصات جمعیت‌ها و ویژگی‌های آب و هوایی مناطق جمع‌آوری اسپرس را نشان می‌دهد.

الکتروفورز پروتئین‌های بذر به روش SDS-PAGE (ژل پلی‌اکریل‌آمید دودسیل سولفات) انجام شد (Laemmli., 1970). از ۱۱۰ ژنوتیپ متعلق به ۱۱ جمعیت مورد مطالعه (هر جمعیت ۱۰ ژنوتیپ) به میزان یک بذر از هر ژنوتیپ جدا گردید. نمونه‌ها به نسبت ۱ بذر به ۳۰۰ میکرولیتر از محلول استخراج (Tris-HCl یک مولار، pH=۷/۵، Na2EDTA یک مولار و ۲-مرکاپتواتانل ۰/۰٤ درصد) و به خوبی در هاون سرد همگن شدند. پس از ده دقیقه سایش، عصاره وارد لوله آزمایش شده و به مدت ۲٤ ساعت در دمای ٤ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. سپس عصاره‌ها برای صاف کردن به مدت ۱۵ دقیقه با دور xg ۱۳۰۰۰ سانتریفوژ شد. محلول صاف شده رویی با محلول بافر نمونه (Tris-HCl نیم مولار، pH= ٦/۸، SDS ۰/۲ درصد و ۲-مرکاپتواتانل ۰/۵ درصد گلیسرول ۱ درصد و برموفنل بلو ۰/۰۲ درصد) به نسبت ۱:۱ مخلوط و به میکروتیوپ درب‌دار اپندروف منتقل و در دستگاه بن ماری در درجه حرارت ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه جوشانده شد. نمونه‌ها تا زمان مصرف در فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردیدند. ۳۰ میکرولیتر از هر نمونه بر روی ژل سدیم دودسیل سولفات پلی اکریل آمید (Laemmli., 1970) بارگیری گردید. ژلها پس از انجام الکتروفورز به مدت ۳۰ دقیقه داخل محلول تثبیت (شامل ۲۰ گرم تری کلرو استیک اسید در ۱۰۰ میلی لیتر آب) قرار گرفتند. سپس به مدت ٤ ساعت در محلول رنگ‌آمیزی (شامل کماسی بلو ۰/۲۵ درصد، متانل ۲۵ درصد و اسید استیک ۱۰ درصد) رنگ‌آمیزی شدند. در نهایت ژل‌ها جهت امکان وضوح باندهای پروتئین به مدت ۱۲ ساعت در دو مرحله در محلول رنگ‌بر (شامل متانل ۲۵ درصد و اسید استیک ۱۰ درصد) قرار گرفت. دستگاه مولد برق با اختلاف قابلیت ۱۸۰ ولت با شدت جریان ٤۰ میلی‌آمپر تنظیم شد. زمان جداسازی پروتئین حدود ۵ ساعت و میزان حرکت عصاره در ژل ۱۰ سانتی‌متر بود. اطلاعات حاصل از پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر به صورت باندهای مجزای پروتئینی برای بذرهای مختلف روی صفحه ژل پلی‌اکریل‌آمید نمایان گردید.

تحلیل داده‌ها

جایگاه هر یک از این باندها بر روی ژل از طریق حرکت نسبی آنها مشخص و به صورت اعداد کمی بیان گردید. براساس وجود (عدد یک) یا عدم وجود هر باند (عدد صفر) در فواصل مختلف، نسبت به تشکیل ماتریس داده‌ها اقدام گردید. فراوانی باندها، نسبت تعداد باندهای پلی‌مورف نسبت به تعداد کل باندها و پلی‌مورفیسم باندها با نرم‌افزار NTSYS-pc (Rohlf., 2004) محاسبه شد. تسهیم گوناگونی ژنتیکی درون و میان‌گروهی توسط آزمون واریانس مولکولی (AMOVA؛ Excoffier *et al.*, 1992) و برنامه نرم‌افزاری (ARLEQUIN 1.1؛ Schnieder *et al.*, 1997) تعیین شد. اهمیت هر جزء واریانس با آزمون permutation (Excoffier *et al.*, 1992) مطالعه شد. فاصله ژنتیکی میان جمعیت‌ها براساس معادله نی (Nei, 1978) برآورد شد. از آزمون UPGMA با نرم‌افزار NTSYS-pc (Rohlf., 2004) و از روش تجزیه به مختصات اصلی PCoA (Gower., 1966) برای تفسیر ماتریس فاصله ژنتیکی استفاده شد. برای بررسی رابطه بین عوامل ژنتیکی و اکولوژیکی از تجزیه همبستگی کانونیک و کارل-پیرسون به‌ترتیب با استفاده از نرم‌افزارهای

Archive of SID

www.SID.ir

SAS و SPSS استفاده گردید. بررسی همبستگی فاصله صفات با یکدیگر توسط آزمون مانتل (Mantel., 1967) انجام شد.

جدول ۱- ویژگی‌های مکانی و ویژگی‌آب و هوایی ۱۱ رقم اسپرس طی سا لهای ۱۹۹۸-۲۰۰۷.

کد بانک ژن	منطقه	نام اختصاری فارسی	طول جغرافیایی (E)	عرض جغرافیایی (N)	ارتفاع از سطح دریا (m)	میانگین بارندگی سالانه (mm)	میانگین دمای سالانه (°C)	رطوبت نسبی (٪)
۱۸	شهرکرد	شهرکرد	۵۰° ۵۸′	۳۲° ۳۲′	۲۰۴۸	۳۳۲/۲	۱۱/۷	۴۶/۱
۱۸۱	گلپایگان	گلپایگان	۵۰° ۲۸′	۳۳° ۴۵′	۱۸۷۰	۲۶۵/۱	۱۴/۶	۳۸/۳
۱۸۲	اصفهان	اصفهان	۵۱° ۶۵′	۳۲° ۴۷′	۱۵۵۰	۱۷۲/۲	۱۶/۹	۳۴/۶
۲۸۱	همدان	همدان	۴۸° ۵۲′	۳۴° ۸۰′	۱۷۴۱	۳۱۳/۱	۱۲/۱	۵۲/۴
۶۲۴	بیجار	بیجار	۴۷° ۶۰′	۳۵° ۸۷′	۱۸۸۳	۲۹۸/۵	۱۱/۶	۴۶/۶
۹۶۲	کاشان	کاشان	۵۱° ۴۵′	۳۳° ۹۸′	۹۸۲	۱۳۸/۱	۱۹/۶	۳۹/۹
۱۵۸۶	گرگان	گرگان آ	۵۴° ۴۳′	۳۶° ۸۳′	۱۳	۵۳۴/۹	۱۸/۳	۷۲/۷
۱۶۰۱	گرگان	گرگان ب	۵۴° ۴۳′	۳۶° ۸۳′	۱۳	۵۳۴/۹	۱۸/۳	۷۲/۷
۱۷۶۳	ارومیه	ارومیه	۴۵° ۰۳′	۳۷° ۵۳′	۱۳۱۵	۲۶۳/۵	۱۲/۶	۵۸/۳
۳۰۰۱	کرج	کرج پلی‌کراس*	۵۱° ۰۰′	۳۵° ۸۲′	۱۳۱۲	۲۷۱	۱۵/۶	۴۵/۷

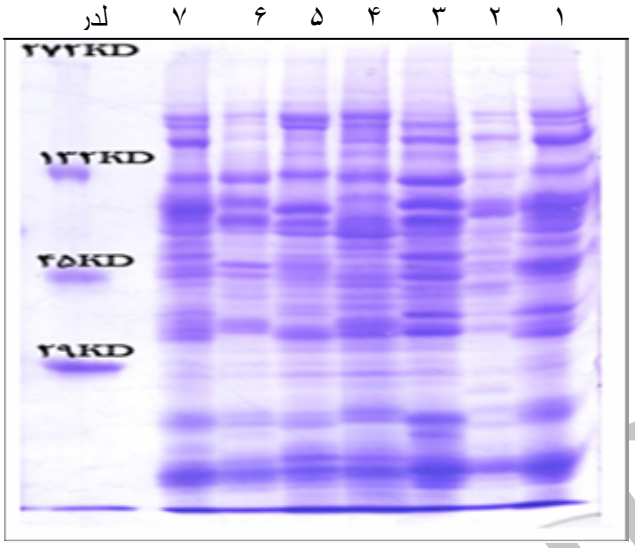
*: اکسشن اصلاح شده توسط مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور

نتایج

در این تحقیق، الگوی پروتئینی ۱۱ جمعیت اسپرس برای تعیین تنوع ژنتیکی موجود مورد بررسی قرار گرفت. تعداد ۴۶ باند در ۱۱ جمعیت اسپرس مورد مطالعه مشاهده گردید. مقایسه تعداد باند در میان جمعیت‌های مختلف اسپرس نشان می‌دهد که بیشترین تعداد باند پروتئینی مربوط به جمعیت‌های کرج (۳۹ باند)، اصفهان و گرگانآ (۳۷ باند) و کمترین تعداد مربوط به جمعیت گلپایگان (۳۲ باند) بود (جدول ۲). فقط دو باند نادر در میان جمعیت‌های اسپرس مشاهده شد که مربوط به جمعیت‌های گلپایگان و کاشان بود. بیشترین درصد پلی‌مورفیسم باندها مربوط به جمعیت‌های همدان و گرگانآ (۶۷/۳۹ درصد) و کمترین درصد پلی‌مورفیسم باندها مربوط به گلپایگان (۴۷/۸۳ درصد) بود. بیشترین و کمترین نسبت تعداد باندهای پلی‌مورف نسبت به کل باندها در همدان (۰/۲۸۴) و گلپایگان (۰/۱۸۲) مشاهده شد. اگرچه باندهای پروتئینی مشترک زیادی در داخل جمعیت‌های مذکور وجود داشت، اما باندهای اختصاصی نیز مشاهده شد که خاص هر جمعیت بودند (شکل ۱).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- نمونه‌ای از تصویر الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر استخراج شده جمعیت‌های مورد مطالعه اسپرس (۱: جمعیت همدان، ۲: جمعیت ارومیه، ۳: جمعیت بیجار، ٤: جمعیت گلپایگان، ۵: جمعیت پلی‌کراس، ٦: جمعیت گرگانآ و ۷: جمعیت شهرکرد)

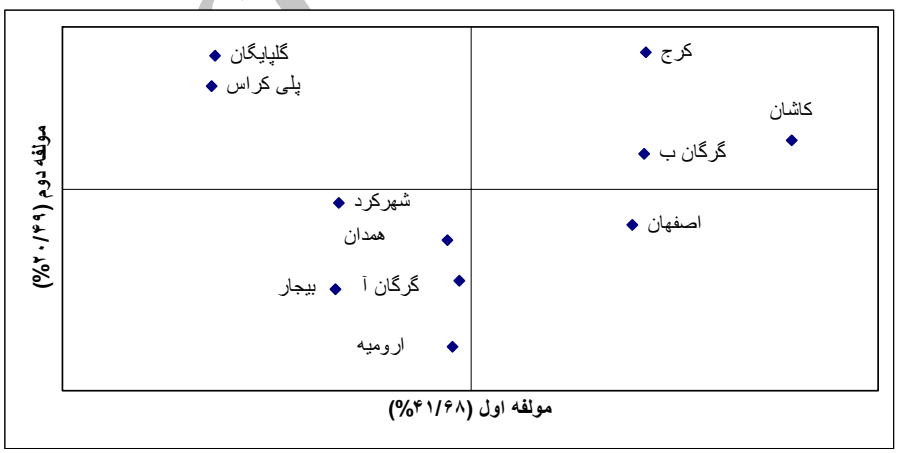
برای تشریح الگوی تمایز، فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها براساس برآورد نااریب فاصله ژنتیکی Nei در بذرهای جمعیت‌های مناطق مختلف محاسبه شد (جدول ۳). مقدار فاصله ژنتیکی از ۰/۰۳٤ (بین جمعیت‌های بیجار و همدارن) تا ۰/۱۷۹ (بین جمعیت‌های کاشان وگلپایگان) با میانگین ۰/۰۷۰ متغیر بود. از فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها برای تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) استفاده شد. با توجه به اینکه حدود ۷٤/۲۷ درصد واریانس در میان سه مؤلفه اصلی قرار دارد که ٤۱/٦۸ درصد از واریانس کل اختصاص به مؤلفه اصلی اول و ۲۰/٤۹ درصد مربط به مؤلفه اصلی دوم است (شکل ۲). همانگونه که در شکل مشاهده می‌شود جمعیت‌های اسپرس کرج، کاشان، گرگانب، اصفهان توسط مؤلفه اصلی اول از جمعیت‌های گلپایگان، پلی کراس، شهرکرد، همدان، بیجار، گرگانآ و ارومیه جدا شده‌اند. به همین ترتیب جمعیت‌های مختلف به وسیله مؤلفه اصلی دوم از یکدیگر متمایز گردیدند. نمودار تشکیل شده نشان‌دهندهٔ تطابق نسبی تمایز ژنتیکی با فاصله جغرافیایی است. برای تشریح الگوی تمایز جمعیت‌ها از روش UPGMA نیز استفاده شد. در دندروگرام حاصل، کلیه جمعیت‌های مورد بررسی به ۲ خوشه عمده تقسیم شدند (شکل ۳). این تقسیم‌بندی مطابق با گروه‌بندی جمعیت‌ها توسط مؤلفه اصلی اول در پلات PCoA بود. همانگونه که مشاهده می‌شود به‌استثناء برخی جمعیت‌ها، اغلب جمعیت‌های مناطق سرد در خوشه اول (برای مثال همدان ، شهرکرد و ارومیه) و جمعیت‌های مناطق گرمتر در خوشه دوم قرار گرفتند (برای مثال کاشان، گرگان ب و اصفهان). در همین ارتباط ضرایب همبستگی جفت ماتریس‌های فاصله ژنتیکی و جغرافیایی جمعیت‌های اسپرس با استفاده از آزمون مانتل محاسبه شد. همبستگی بین ماتریس‌های فاصله پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر مناطق مختلف و جغرافیایی بسیار کم و منفی بود که از لحاظ آماری نیز

Archive of SID

www.SID.ir

معنی‌دار نبود (R=۰/۰۲ ، p=۰/۲٤۰) (شکل ٤). پس در مجموع رابطه جغرافیایی با ویژگی‌های باندهای پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر مناطق مختلف به وسیلهٔ آزمون مانتل ثابت نشد. نتیجه تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) (جدول ٤) نیز سطح نسبتاً بالایی از تمایز ژنتیکی را در درون جمعیت‌ها (۸٤ درصد) نشان داد و فقط ١٦ درصد از گوناگونی میان جمعیت‌های مختلف قرار داشت.

همبستگی بین پارامترهای تنوع ژنتیکی و عوامل محیطی: تجزیه و تحلیل رابطه پیرسون نشان داد که بین هفت شاخص پارامترهای تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مختلف و عوامل اقلیمی رابطه زیادی وجود نداشت و فقط بین تعداد باندهایی با فراوانی کمتر یا مساوی ۵۰ درصد و میانگین بیشینه دما یک رابطه مثبت معنی‌دار در سطح ۵٪ مشاهده گردید. هیچ رابطه‌ای بین ارتفاع از سطح دریا و پارامترهای تنوع ژنتیکی جمعیت‌های اسپرس مورد بررسی وجود نداشت. آزمون Wilks' Lambada با فرض وجود حداقل یک همبستگی کانونیک معنی‌دار بین عوامل محیطی و متغیرهای ژنتیکی انجام گردید. مقدار F محاسبه شده معادل ۰/٦۷۲ بود که در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار نگردید. بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری نمود که بین متغیرهای محیطی و ژنتیکی همبستگی وجود ندارد. با توجه به عدم معنی‌داری همبستگی‌ها، اولین جفت از متغیرهای کانونیک مورد اهمیت قرار می‌گیرد. مقادیر ویژه همبستگی کانونیک نشان داد که ۹۱/۲ درصد تغییرات در اولین تابع همبستگی کانونیک و ٦/۸ درصد تغییرات مربوط به دومین تابع همبستگی کانونیک بوده است. ضرایب همبستگی کانونیک بین عوامل محیطی و متغیرهای ژنتیکی برای اولین تابع همبستگی کانونیک که در واقع بیشترین تأثیر را داشته نشان می‌دهد که از میان عوامل محیطی متوسط دمای سالانه (۰/۸۵٤) و از میان عوامل ژنتیکی تعداد باند نادر و تعداد باندها با فراوانی بیش از ۰/۵۰ (به‌ترتیب با ۰/۵۲۸ و ۰/۵۱۸) بیشترین اهمیت را داشته است (جدول ۵).



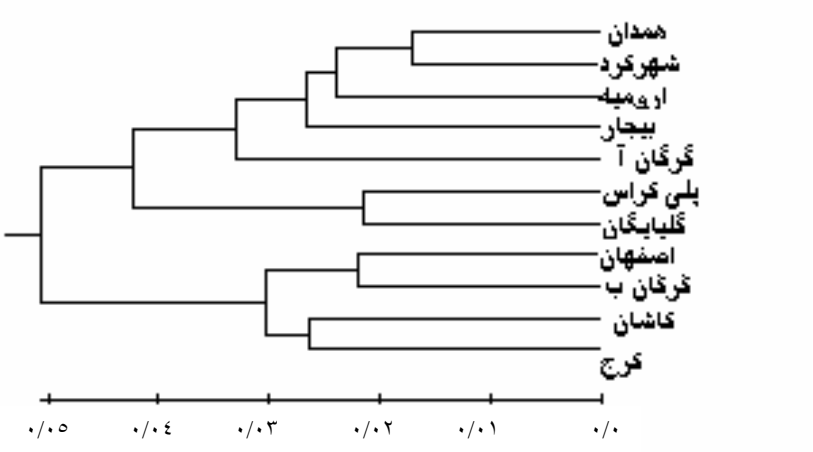
شکل ۲- نمودار رسته‌بندی (PCoA) بذرهای ۱۱ جمعیت اسپرس براساس فاصله ژنتیکی با استفاده از دو مؤلفه اصلی

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲- مقادیر پلی‌مورفیسم و تنوع ژنتیکی ۱۱ جمعیت گونه اسپرس مورد مطالعه براساس پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر

جمعیت	بیجار	همدان	شهر کرد	ارومیه	اصفهان	گرگان (آ)	پلی کراس	گلپایگان	کاشان	کرج	گرگان (ب)
تعداد باند	۳۵	۳٦	۳٦	۳٦	۳۷	۳۷	۳۵	۳۲	۳۷	۳۹	۳۷
تعداد باندها با فراوانی بیش از ۰/۰۵	۳۵	۳٦	۳٦	۳٦	۳۷	۳۷	۳۵	۳۲	۳۷	۳۹	۳۷
تعداد باند نادر	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۱	۰	۰
تعداد باندها با فراوانی کمتر از ۰/۲۵	۰	۱	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۲	۱
تعداد باندها با فراوانی کمتر از ۰/۵۰	۲	۳	۳	۳	۵	٤	۲	۱	٤	٦	٤
درصد پلی‌مورفیسم باندها	٦۳/۰٤	٦۷/۳۹	٦۰/۸۷	۵٦/۵۲	۵۸/۷۰	٦۷/۳۹	۵۸/۷۰	٤۷/۸۳	۵٤/۳۵	٦۳/۰٤	۵۰/۰۰
نسبت تعداد باندهای پلی‌مورف نسبت به تعداد کل باندها	۰/۲۵۵	۰/۲۸٤	۰/۲۳۷	۰/۲۳۵	۰/۲۳٤	۰/۲۷۰	۰/۲۰٤	۰/۱۸۲	۰/۲۱۷	۰/۲۳۰	۰/۲۱٤
استاندارد خطا نسبت تعداد باندهای پلی‌مورف نسبت به تعداد کل باندها	۰/۰۳۲	۰/۰۳۳	۰/۰۳۲	۰/۰۳۳	۰/۰۳۳	۰/۰۳۲	۰/۰۳۱	۰/۰۳۲	۰/۰۳۳	۰/۰۳۱	۰/۰۳٤



شکل ۳- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA بر روی بذرهای ۱۱ جمعیت اسپرس

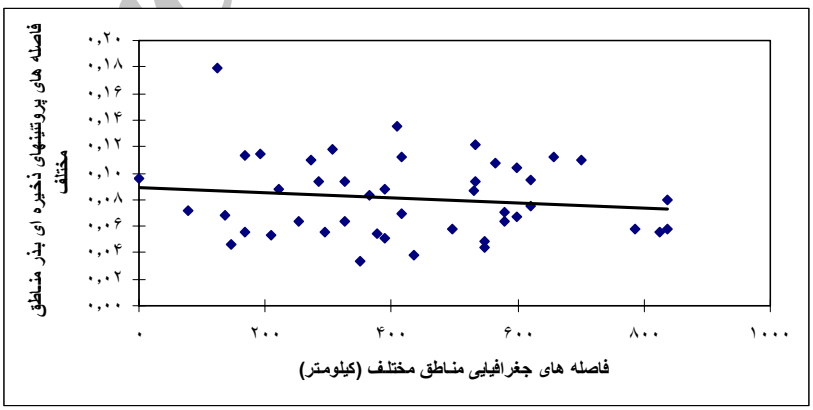
Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۳- ماتریس برآورد نااریب فاصله ژنتیکی بین ۱۱ جمعیت اسپرس براساس الگوی پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر

	بیجار	همدان	شهرکرد	ارومیه	اصفهان	گرگان (آ)	پلی کراس	گلپایگان	کاشان	کرج	گرگان (ب)
بیجار	۰										
همدان	۰/۰۴۷	۰									
شهرکرد	۰/۰۵۷	۰/۰۳۴	۰								
ارومیه	۰/۰۵۶	۰/۰۳۹	۰/۰۵۷	۰							
اصفهان	۰/۰۸۶	۰/۰۵۰	۰/۰۷۲	۰/۰۵۶	۰						
گرگان آ	۰/۰۷۵	۰/۰۶۴	۰/۰۶۷	۰/۰۵۸	۰/۰۴۹	۰					
پلی کراس	۰/۰۷۸	۰/۰۷۳	۰/۰۴۹	۰/۰۹۶	۰/۱۱۸	۰/۱۰۳	۰				
گلپایگان	۰/۰۸۳	۰/۰۸۷	۰/۰۶۹	۰/۱۱۳	۰/۱۱۳	۰/۰۹۴	۰/۰۴۳	۰			
کاشان	۰/۱۳۶	۰/۰۹۴	۰/۱۱۵	۰/۱۱۰	۰/۰۵۵	۰/۱۱۲	۰/۱۶۶	۰/۱۷۹	۰		
کرج	۰/۱۱۸	۰/۰۶۳	۰/۰۸۸	۰/۱۰۷	۰/۰۵۵	۰/۰۹۳	۰/۱۱۵	۰/۱۱۰	۰/۰۵۳	۰	
گرگان ب	۰/۰۹۵	۰/۰۷۱	۰/۱۰۴	۰/۰۸۰	۰/۰۴۴	۰/۰۹۶	۰/۱۱۹	۰/۱۲۱	۰/۰۶۹	۰/۰۶۴	۰

جدول ٤- تجزیه واریانس مولکولی داده‌های پروتئین بذرهای ۱۱ جمعیت اسپرس براساس پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر

منبع تغییرات	درجه آزادی	جمع میانگین‌ها	میانگین میانگین‌ها	درصد واریانس	احتمال
بین جمعیت‌ها	۱۰	۱٤۸/٦٥٥	۱٤/۸٦٥	۱٦	
درون جمعیت‌ها	۹۹	٥۰۲/٦	٥/۰۷۷	۸٤	۰/۰۰۱
کل	۱۰۹	٦٥۱/۲٥٥	۱۹/۹٤۲		



شکل ٤- لگاریتم ضریب همبستگی بین ماتریس‌های فاصله ژنتیکی پروتئین‌های ذخیره‌ای بذرهای اسپرس مناطق مختلف با فاصله جغرافیایی (R=۰/۲٤۰، p=۰/۲)

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۵- ضرایب همبستگی کانونیک بین پارامترهای تنوع ژنتیکی و عوامل محیطی جمعیت‌های مورد مطالعه

	مؤلفه اول (٪۹۱/۲)	مؤلفه دوم (٪٦/٨)
متغیرهای محیطی		
ارتفاع از سطح دریا	-۰/۳۸۵	۰/٦۰٤
میانگین بارندگی سالانه	-۰/۳۹۵	-۰/۳۹۹
میانگین دمای سالانه	**۰/۸۵٤**	-۰/۱۵٦
رطوبت نسبی	-۰/۲٦۳	-۰/٦۸٤
متغیرهای ژنتیکی		
تعداد باند	۰/۳۵۲	-۰/۵۹۲
تعداد باند نادر	**۰/۵۲۷**	۰/٦۱۷
تعداد باندها با فراوانی کمتر از۰/۲۵	۰/۱۰۸	۰/۰۷۸۸
تعداد باندها با فراوانی بیش از ۰/۵۰	**۰/۵۱۹**	-۰/۳۹۹
نسبت تعداد باندهای پلی‌مورف نسبت به تعداد کل باندها	-۰/۳۹۹	-۰/۳۸۹

بحث

در این پژوهش گوناگونی ژنتیکی جمعیت‌های مختلف اسپرس به‌عنوان ضرورتی اجتناب‌ناپذیر برای برنامه‌های اصلاحی مطالعه گردید. نتایج حکایت از وجود تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای در بین جمعیت‌های مختلف اسپرس داشت. براساس یافته‌های Gardiner و Forde (۱۹۸۸) اختلاف موجود در فراوانی باندها در افراد و به تبع آن در جمعیت‌های مختلف ناشی از تفاوت در تعداد ژنهای کد کننده پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر است. چنین مقادیری از گوناگونی در پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر، قابل مقایسه با نتایج Emre و همکاران (۲۰۰۷) است که تنوع ژنتیکی هشت گونه از اسپرس را در ترکیه مطالعه نموده‌اند. از آنجایی که ایران و ترکیه مرکز تنوع جنس اسپرس هستند، چنین تنوع بالایی در ویژگی‌های مختلف این گیاه در کشور دور از انتظار نمی‌باشد. بنابراین، در برنامه‌های اصلاحی اسپرس باید تنوع ژنتیکی ارقام اسپرس بوسیله استفاده از والدین مختلف افزایش یابد. افزایش اساس ژنتیکی برای اصلاح اسپرس می‌تواند بوسیله کاربرد سیستماتیکی ژرم‌پلاسم که الگو پروتئینی متفاوتی داشته و ویژگی‌های کمی بهتری دارند حاصل شود.

تسهیم واریانس ژنتیکی درون و میان جمعیتی توسط آزمون واریانس مولکولی AMOVA، سطح نسبتاً بالایی از واریانس ژنتیکی را در درون جمعیت‌ها (۷۹ درصد) برآورد نمود، به‌طوری‌که فقط ۲۱ درصد واریانس کل در میان جمعیت‌ها قرار داشت. بنابراین، اختصاص الگوی پروتئینی خاصی به هر یک از جمعیت‌ها و یا برخی جمعیت‌ها امکان‌پذیر نگردید. شناسایی جمعیت‌ها و اختصاص الگوی پروتئینی خاصی به ارقام مختلف گیاهی موضوعی است که براساس نوع گونه نتایج ضد و نقیضی در مورد آن منتشر گردیده است. الگوی پروتئینی بذر بسیاری از گیاهان تاکنون با اهدافی مثل مطالعه تنوع ژنتیکی و شناسایی ارقام زراعی مطالعه شده است که می‌توان برای نمونه از مطالعاتی که بر روی *Ricinus communis* (*Euphorbiaceae*،

Archive of SID

www.SID.ir

1985 Sathaiah & Reddy)، گونه‌های (*Solanaceae*، *Capsicum*، Panda *et al.*, 1986)، برنج (*Poaceae*، Aliaga-Morel *et al.*, 1987)، گونه‌های *Fabaceae*، *Arachis*(Bianchi-Hal *et al*., 1993)، ارقام پنبه Naveed (*et al*., 2005)، (Nisar *et al*., 2006) *Pisum Sativum*، (Mirza *et al*., 2007) *Avena fatua* و ارقام گندم Mohd *et al.*, 2007) انجام شده نام برد که عموماً حکایت از کاربرد بالای مارکر پروتئین در شناسایی گونه‌ها و ارقام مختلف یک گونه دارد. ولی نتایج بسیاری نیز وجود دارد که حاکی از عدم جداسازی ارقام مختلف توسط پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر است (Alipour *et al*., 2002; Javaid *et al*., 2004; Sihag *et al*., 2004; Malik *et al*., 2009).

از آنجایی که جمعیت‌های مورد مطالعه اختلاف قابل ملاحظه‌ای از نظر پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر نشان دادند، پیدا کردن ارتباطی بین منشأ جمعیت‌ها و الگوی گروه‌بندی، بسیار دشوار بود. به‌طوری‌که ساختار جغرافیایی در ویژگی‌های باندهای پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر اسپرس مناطق مختلف به وسیله آزمون مانتل مشاهده نگردید و ضریب همبستگی بین ماتریس‌های فاصله ژنتیکی و جغرافیایی از نظر آماری معنی‌دار نگردید. نتایج بدست آمده در این بررسی که حکایت از عدم وجود ارتباط بین تنوع ژنتیکی و توزیع جغرافیایی است در گیاهان مختلفی گزارش شده است (Alipour *et al*., 2002; Javaid *et al*., 2004; Sihag *et al*., 2004; Malik *et al*., 2009). به منظور پی‌بردن به وجود ارتباط بین متغیرهای محیطی و پارامترهای ژنتیکی در جمعیت‌های اسپرس از تجزیه همبستگی کانونیک و پیرسون استفاده گردید. نتایج تجزیه همبستگی کانونیک نشان میدهد که در مجموع ارتباطی بین پارامترهای ژنتیکی و محیطی وجود ندارد ولی در مناطقی که دارای متوسط دمای بالاتری هستند تعداد باند نادر و تعداد باندها با فراوانی بیش از ۰/۵۰ بیشتری دارند. این نتایج با نتایج همبستگی پیرسون نیز مطابقت مینماید. با توجه به این واقعیت که در بسیاری از گیاهان، گوناگونی پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر ارتباطی با توزیع جغرافیایی و عوامل اکولوژیکی نشان نمی‌دهند، پس این مارکر می‌تواند ابزار مفیدی برای شناسایی جمعیت‌های مناسب برای انجام دورگ‌گیری باشد. زیرا تاکنون مطالعات بسیاری انجام شده تا مارکرهای مناسبی برای گیاهان مختلف شناسایی گردد که تحت تأثیر عوامل محیطی نباشند. البته وجود گوناگونی بالا نیز از شروط مهم دیگر کارایی چنین مارکری است، به‌طوری‌که Ghafoor و همکاران (۲۰۰۲) با مطالعه پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر جمعیت‌های مختلف *Vigna mungo*، نه‌تنها هیچ ارتباطی بین تنوع ژنتیکی و توزیع جغرافیایی جمعیت‌های مورد مطالعه پیدا نکرده‌اند، بلکه تنوع درون جمعیتی بسیار پایینی نیز درون جمعیت‌ها ثبت نموده‌اند. براساس این مشاهدات آنها الگوی پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر را فقط مارکر مناسبی برای مطالعه میان گونه‌ای پیشنهاد نموده‌اند. درحالی‌که با توجه به تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای که در جمعیت‌های مورد مطالعه اسپرس مشاهده شد، می‌توان براساس نتایج پژوهش حاضر متمایزترین جمعیت‌ها را انتخاب نمود تا بوسیله تلاقی بین آنها بیشترین میزان هتروزیس حاصل گردد. بدین‌ترتیب جمعیت‌های کاشان و گلپایگان نه تنها بیشترین فاصله ژنتیکی را در میان ۱۱ جمعیت مورد مطالعه داشتند، بلکه هر یک دارای یک باند نادر نیز بودند، به‌طوری‌که برای ایجاد دورگی که از قابلیت تنوع ژنتیکی بالایی برخوردار باشد، معرفی شدند.

سپاسگزاری

این مقاله بخشی از نتایج طرح تحقیقاتی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور (به شماره ۸۷۰۰۱-

Archive of SID

www.SID.ir

۷۹۰۱-۰۹-۰۹-۱۲) می‌باشد. ازاین‌رو از همکاران محترم مؤسسه مذکور به‌دلیل در اختیارگذاشتن امکانات مورد نیاز در اجرای این تحقیق تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع مورد استفاده

- Aliaga-Morel, J.R., Culianez-Macia, F.A., Clemente-Marin, G. and Primo-Yufera, E., 1987. Differentiation of rice cultivars by electrophoresis of embryo protein. Theoretical and Applied Genetics, 74: 224-232.
- Alipour, H., Rezai, A., Meibodi, S.A.M. and Taheri, M., 2002. Evaluation of genetic variation in soybean lines using seed protein electrophoresis. Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources, 5: 85-96.
- Bianchi-hall, C.M., Keys, R.D., Stalker, H.T. and Murphy, J.P., 1993. Diversity of seed storage protein patterns in wild peanut (Arachis, Fabaceae) species. Plant Systematic and Evolution, 186: 1-15.
- Das, S. and Mukarjee, K.K. 1995. Comparative study on seed proteins of *Ipomoea*. Seed Science and Technology, 23: 501– 509.
- Emre, I., Turgut-Balik, D., Sahin, A. and Kursat, M., 2007. Total electrophoretic band patterns of some *Onobrychis* species growing in Turkey. American-Eurasian Journal of Agriculture and Environment Science, 2: 123-126.
- Excoffier, L., Smouse, P. and Quattro, J., 1992. Analysis of molecular variances among DNA restriction data. Genetics, 131: 479-491.
- Gardiner, S.E. and Forde, M.B., 1988. Identification of cultivars and species of pasture legumes by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel genetic diversity in Black gram (*Vigna mungo* L. Hepper). Field Crops Research, 69: 183–190.
- Ghafoor, A. and Arshad, M., 2008. Seed protein profiling of *Pisum sativum* (L) germplasm using sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) for investigation of biodiversity. Pakistan Journal of Botany, 40: 2315-2321.
- Ghafoor, A., Zahoor, A., 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: 367-372.
- Gower, J.C., 1966. Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. Biometrika, 53: 325-338.
- Hasani, J., 2004. effect of P on seed amount on dry matter of *Onobrychis sativa.* Iranian Journal of Range and Desert Research, 11: 365-383.
- Javaid, A., Ghafoor, A. and Anwar, R., 2004. Seed storage protein electrophoresis in groundnut for evaluating genetic diversity. Pakistan Journal of Botany, 30: 25-29.
- Karimi, E., 1990. *Medicago*. University of Tehran Press. Tehran, pp. 56.
- Ladizinsky, G. and Hymowitz, T. 1979. Seed protein electrophoresis in taxonomic and evolutionary studies. Theoretical and Applied Genetics, 54: 145-151.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685.
- Malik, M.F.A., Qureshi, A.S., Ashraf, M., Khan, M.R. and Javed, A., 2009. Evaluation of genetic diversity in soybean (*Glycine max*) lines using seed protein electrophoresis. Australian Journal of Crop Science, 3:107-112.
- Mantel, N., 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Research, 27: 209-220.
- Mirza, B., Shoaib, M., Ahmad, M. and Fu, Y.B., 2007. Genetic diversity in Pakistani populations of *Avena fatua* revealed by seed storage protein polymorphism. Crop Science, 2: 41-48.
- Mohd, S., Alam, Z., Zahir, A., Weqar, A., Taufiq, A. and Ikhtir, K., 2007. Characterization of wheat varieties by seed strong protein electrophoresis. African Journal of Biotechnology, 6: 497-500.
- Naveed, M., Motomitsu, K. and Ghulam, M.A., 2005. Genetic differentiation of cotton cultivars by polyacrylamide gel electrophoresis. Central European Agriculture, 6: 69-76.
- Nei, M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics, 89: 583-590.
- Nisar, M., Ghafoor, A., Rashid khan, M. and Sharif Qureshi, A., 2006. Screening of *Pisum Sativum* L. germplasm against *Erysiphe pisi* syd.. ACTA Biologica Cracoviensia Series Botanica, 48: 33-37.
- Panda, R.C., Kumar, O.A. and Rao. K.G.R., 1986. The use of seed protein electrophoresis in the study of phylogenetic relationship in Chile pepper (*Capsicum* L.). Theoretical and Applied Genetics, 7: 665-670.
- Rohlf, J.F., 2004. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.11. Exeter, Setauket, NY.
- Sathaiah, V. and Reddy, T.P., 1985. Seed protein profile of caster (*Ricinus communis* L.) and some *Jatropa* species. Genetics in Agriculture, 39: 35-43.
- Schneider, S., Kueffer, J., Roessli, D. and Excoffier, L., 1997. Arlequin ver 11: software for population genetic data analysis Genetic and Biometry. Laboratory University of Geneva

Sihag, R., Hooda, J.S., Vashishtha, R.D. and Malik, B.P.S., 2004. Genetic divergence in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. Annals of Biology, 20: 17-21.

Archive of SID

www.SID.ir

Genetic diversity of *Onobrychis sativa* populations using seed storage proteins and its association with ecological factors

P. Salehi Shanjani[1]*, M. Gharehchaee[2], A.A. Jafari[3] and G. Bakhshi Khaneki[4]

1*- Corresponding author, Asist. Prof., Natural Resources Gene Bank, Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, I.R.Iran, E-mail: psalehi@rifr-ac.ir
2- M.Sc., Biotechnology, Payam Noor University, Tehran, I.R.Iran
3- Prof., Natural Resources Gene Bank, Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, I.R.Iran
4- Prof., Payam Noor University, Tehran, I.R.Iran

Received: 02.16.2011 Accepted: 05.19.2011

Abstract

Onobrychis sativa is a very important legume used as forage in Iran. However, improvement of *O. sativa* is slow and time consuming, being made essentially by introduction of the foreign genetic material. This study evaluated seed protein profiles of 110 genotypes of *O. sativa* from 11 populations, to determine the extent of genetic diversity. On the basis of SDS-PAGE, 46 reproducible bands were used for analysis and genetic diversity was estimated based on the number of different protein peptides. The rate of polymorphic bands over the total bands detected ranged from 0.182 to 0.284 with an average of 0.233. SDS-PAGE of seed proteins showed high inter- and intra-population diversity and no clear differentiation on the basis of origin or source. The correlation between genetic and geographical distance matrices was not significance, indicating lack of cline trends in variation of seed storage proteins. It is suggested that the genetic base of cultivated *O. sativa* should be broadened by involving diverse parents in the breeding program. Expansion of the genetic base for *O. sativa* breeding might be accomplished by systematic use of germplasm that differs in protein profiles and has better quantitative traits.

Key words: *Onobrychis sativa*, Genetic diversity, Seed storage proteins, Ecological factors.

Archive of SID

www.SID.ir