مجله علوم گیاهان زراعی ایران
دوره ۴۱، شماره ۱، ۱۳۸۹ (۱۲۱-۱۱۳)

بررسی تنوع ژنتیکی در ارقام بومی و سنتتیک یونجه با نشانگر پروتئین ذخیره‌ای بذر

حسن مانوسی[۱]*، مصطفی ولیزاده[۲]، سعید زهتاب سلماسی[۳]، سعید اهری زاد[۴] و محمود سلوکی[۵]
۱، ۵، دانشجوی سابق کارشناسی و استادیار دانشکده کشاورزی دانشگاه زابل
۲، ۳، ۴، استاد و استادیاران دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز
(تاریخ دریافت: ۸۶/۳/۱- تاریخ تصویب: ۸۸/۱/۲۳)

چکیده

به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی جمعیت سنتتیک یک (Syn_1) با جمعیت آزادگرده افشان نسل اول (Syn_2) و یکی از ارقام والدی(قره‌یونجه)، حدود ۳۵ تا ۵۰ فرد از هر جمعیت از طریق سه نوع پروتئین ذخیره‌ای تک بذر مورد مطالعه قرار گرفتند. انجام الکتروفورز SDS-PAGE پروتئین‌های ذخیره‌ای تک بذر (S2, S1 و S3) برای سه جمعیت یونجه نشان داد که میانگین فاصله افراد درون جمعیتی براساس ضریب تطابق ساده در Syn_1 و قره‌یونجه به ترتیب ۰/۲۷٤±۰/۰۰٥٤ و ۰/۲۷۰±۰/۰۰۸۱ بدون اختلاف معنی‌دار هستند ولی این میانگین در جمعیت Syn_2 بطور معنی‌داری کمتر و برابر ۰/۰۰۸۱ ± ۰/۲۵۱ بود که نشان‌دهنده شباهت بیشتر افراد در نسل Syn_2 است. بنابراین نتایج حاصله نشان داد که جمعیت سنتتیک یک و قره‌یونجه در پروتئین‌های بررسی شده (S2, S1, S3 و پروتئین‌های کل) بیشترین فاصله ژنتیکی درون جمعیتی را به خود اختصاص داده‌اند. اطلاع از فاصله ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای پروتئینی در کنار نشانگرهای دیگر از جمله مورفولوژیکی و دی.ان.ای می‌تواند در شناسائی والدین مناسب برای برنامه‌های دورگ‌گیری و توسعه هیبرید مناسب باشد.

واژه‌های کلیدی: یونجه، سنتتیک یک، میزان تنوع در نسل‌ها، نشانگر پروتئین.

مقدمه

یونجه (*Medicago sativa* L.) گیاه علوفه‌ای از خانواده لگومینوز و یک گونه چند شکلی است که با بسیاری از خاکها و اقلیم‌ها سازگاری دارد. میزان تنوع درصفات وراثتی آن بسیار زیاد است. اینترگرسیون گونه *M. falcata* با *M. sativa* باعث افزایش تنوع ژنتیکی و دامنه سازگاری آن شده است (Rezae, 1994). توارث صفات در یونجه تا حدودی به خاطر ماهیت اتوتتراپلوئیدی تقسیم میوز یا تقسیم با کاهش کروموزومی، پیچیده است.

تشکیل گامتهای دیپلوئید، رفتار تولید مثلی یونجه را شدیداً تحت الشعاع قرار می‌دهد (Rezae, 1994).

علی‌رغم مشکلات ناشی از اتوتتراپلوئیدی، موفقیت‌های شایانی در به نژادی یونجه کسب شده است. متخصصین اصلاح یونجه مجموعه بزرگی از واریته‌ها را تولید کرده اند که از لحاظ عملکرد، نحوه رشد، مواد متشکله و ترکیبات شیمیائی، سازگاری با مناطق مختلف، بنیه خوب گیاهچه، رویش مجدد پس از برداشت، دوره خواب و مقاومت به بسیاری از بیماریها و آفات و نماتدها متمایز هستند (Karimi, 1997). آگاهی از تنوع ژنتیکی گونه‌ها اهمیت زیادی دارد. روش‌های کلاسیک اصلاح نباتات رفته‌رفته تنوع ژنتیکی را کاهش می‌دهند و این کاهش می‌تواند برای آینده برنامه‌های اصلاحی خطرآفرین باشد. هر چند که امروزه نشانگرهای

* نویسنده مسئول: حسن مأنوسی تلفن: ۰۹۱۴-۱۸۵۶۰۱۹ E-mail: hasanmanousi@yahoo.com

مولکولی متعددی برای برآورد تنوع ژنتیکی وجود دارد ولی الکتروفورز پروتئین‌ها و ایزوزیم‌ها همواره روشی مناسب 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 مرتبط با DNA است.

پروتئین‌های ذخیره‌ای ضمن داشتن پلی‌مورفیسم زیاد بسیار با ثبات هستند (Mclendon et al., 1993, Abdmishani & Boushehri 1999, Valizadeh, 2001). عوامل محیطی روی پروتئین‌های بذور رسیده بی‌تاثیر و یا کم تاثیر هستند و همانند آیزوزیم‌ها نحوه توارث آنها بصورت همبارز است. با این تفاسیر الگوهای الکتروفورزی پروتئین‌های بذور رسیده چه به تنهائی و یا با سایر نشانگرها معیار بسیار خوبی برای شناسائی جوامع مختلف گیاهی و ارقام می‌باشد. هر چند اکثر تجزیه و تحلیل‌های پروتئین‌های ذخیره در گونه‌هایی به کار رفته است که بذر یا فرآورده شان قسمت خوراکی آنهاست با این حال پروتئین‌های بذر برای شناسائی ارقام مراتع نیز به کار رفته است (Abdmishani & Boushehri, 1999).

توانائی تفکیک بین دو گونه یا رقم در اصلاح نباتات و همچنین در ثبت ارقام حائز اهمیت می‌باشد. بویژه در زمان تصمیم‌گیری برای تلاقی بین ارقام، این تشخیص ازاهمیت فزاینده‌ای برخوردار است، در این زمینه، پروتئین‌های ذخیره‌ای بسیارکارا بوده و مارکرهای قابل اعتمادی بشمار می‌روند (Radic, 1998).

Signor et al. (2005) تعداد ۵۰ ژنوتیپ یونجه یکساله *M. trancatula* را از نظر پروتئین بذر مورد بررسی قرار دادند. پروفیل‌های الکتروفورزی تک بعدی ۴۶ نوار بزرگ پلی پپتیدی آشکار کرد که در مجموع ۲۶ تا پلی‌مورفیسم نشان داد. پلی‌مورفیسم برای پروتئین‌های بزرگ بذر ژنوتیپ‌ها را به ۴ گروه کلاستربندی کرد. در داخل گروه‌های ۲، ۳ و ۴ میانگین شاخص شباهت ۹۰٪ بود. در بین سه گروه میانگین شباهت بین ۰/۸۵ الی ۰/۸۷ برآورد گردید. میانگین تشابه در داخل گروه ۱، ۰/۸۱ و میانگین تشابه بین گروه ۱ و سایر گروه‌ها بین ۰/۷۱ الی ۰/۷۵ بود.

Krichko & Bewly (2000) پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر را در ۲۷ واریته یونجه (*M. sativa*) مورد بررسی قرار دادند. الگوهای پروتئین بطور قابل ملاحظه‌ای برای مواد گیاهی ثابت بودند. الکتروفورز یک بعدی و دو بعدی تنها اختلافات اندکی را در ساختار پلی‌پپتیدی درون هر کدام از سه گروه اصلی پروتیئن‌های ذخیره‌ای (گلوبولین ۷S، گلوبولین ۱۱S و آلبومین ۲S) نشان داد. این تنوع کم هیچ اطلاعاتی در مورد روابط والدی تا تکامل در میان مواد مورد آزمایش فراهم نکرد.

Koleva et al. (1992) طی پژوهشی بر روی پروتئین ذخیره‌ای بذر ژنوتیپ‌های *M. falcate*، *M. arabica* و *M. Sativa No2* پروتئین‌های ذخیره‌ای گلوبولین (لگومین و آلفین) را مورد بررسی قرار دادند. در تمامی ژنوتیپ‌ها پلی پپتیدهای جزءهای S-1 و S-2 وزن مولکولی مساوی داشتند. نتایج این بررسی نشان داد که پروتئین ذخیره‌ای ۷S و همچنین ۱۱S در ژنوتیپ‌های مورد بررسی هتروژنی کمی و کیفی داشتند.

در بررسی Krochko et al. (1990) روی ۲۹ زیر گونه و رقم *M. sativa*، پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر، دو نوع پروتئین ذخیره‌ای آلفین و مدیکاگین شناسائی شد که ژنوتیپ‌ها از نظر پروتئین‌های آلفین و مدیکاگین خیلی مشابه بودند و اختلافات بین ژنوتیپ های بررسی شده بیشتر کمی بود تا کیفی.

Xu et al. (1991) ۹ مرحله مرفولوژیکی و تجمع پروتئین ذخیره‌ای بذور یونجه را از مرحله گرده‌افشانی تا رسیدگی کامل مورد بررسی قرار دادند. در این مراحل سه کلاس پروتئین ذخیره‌ای بدست آمد که شامل کمپلکس ۱۱S(مدیکاگین) و پروتئین ۷S (آلفین) و جزء آلبومین ۲S و بعلاوه تعداد کمی از پروتئین‌های ذخیره‌ای HMW[1] بود.

در بررسی Li et al. (1990) روابط خویشاوندی واریته‌های بومی یونجه، پروتئین‌های ذخیره‌ای تک بذر ۱۸ واریته یونجه چینی و ۹ منبع ژرم پلاسم از آمریکای شمالی از طریق SDS- PAGE مورد مطالعه قرار گرفت. متوسط فاصله ژنتیکی۱۸واریته بومی یونجه ۰/۵۷ برآورد شد. اختلاف ژنتیکی میان ۱۸ واریته‌چینی در مقایسه با ۹ واریته از آمریکای شمالی،کمتر بود. این امر به توزیع

1. High molecular weight

جغرافیایی نزدیک و تبادل ژنی زیاد واریته‌های بومی‌چینی نسبت داده شد.

با توجه به دگرگشنی و تتراپلوئیدی بودن یونجه (Ronfort et al. 1998) انتظار می‌رود که تنوع ژنتیکی زیادی در داخل جمعیت‌های یونجه وجود داشته باشد. Kidwel et al. (1994) نشان دادند که هر چه قدر فاصله ژنتیکی افراد در جمعیت یا میزان هتروزیگوس در آن بیشتر باشد، عملکرد علوفه بیشتر خواهد شد. این قدرت دو رگ در سنتتیک صفر بیشترین میزان را دارد.

بنابراین هدف از این پژوهش بررسی میزان تنوع در جمعیت سنتتیک یک تولید شده در دانشگاه تبریز و مقایسه آن با جمعیت سنتتیک دو حاصل از آزادگرده افشانی جمعیت سنتتیک یک و نیز برخی از والدهای بکار رفته درتولید رقم سنتتیک با استفاده از مارکرهای پروتئینی بود. اطلاع از فاصله ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای پروتئینی در کنار نشانگرهای دیگر از جمله مورفولوژیکی و دی. ان. ای می‌تواند در شناسائی والدین مناسب برای برنامه‌های دورگ‌گیری و توسعه هیبرید مناسب باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

مواد گیاهی شامل جمعیت بومی قره‌یونجه، جمعیت سنتتیک یک (Syn_1) و جمعیت سنتتیک دو (Syn_2) تهیه شده در دانشگاه تبریز بود که برای الکتروفورز SDS-PAGE استفاده شد.

استخراج پروتئین‌ها

برای استخراج پروتئین از بذر از روش Krochko et al. (2000, 1990) به شرح زیر استفاده شد. پروتئین‌های ذخیره‌ای بوسیله سه استخراج پشت سر هم از تک بذرها با استفاده از سه بافر استخراجی مختلف جدا شدند. برای اینکار از هر جمعیت ۱۸ بذر سالم به طور تصادفی انتخاب شد (این کار برای هر رقم دو بار انجام شد). پس از ریختن ۱۰۰ میکرولیتر بافر استخراج I (NaCl ۰/۲مولار، pH=۷) در لوله های اپندرف ۱/۵ میلی لیتری حاوی یک بذر، به مدت ۴ ساعت در دمای معمولی اتاق نگه داشته شد. پس از این مدت تک بذرهای داخل تیوب‌ها له و بهم زده شدند. سپس به مدت ۴ ساعت در داخل بافر استخراج I عمل انکوباسیون انجام شد و نهایتاً در سانتریفوژ یخچال‌دار (هتیش EBA12R) به مدت ۱۵ دقیقه و با سرعت ۱۰۰۰۰ rpm و ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند. بعد از سانتریفوژ محلول روئی (سوپرناتانت[1]) با سمپلر به طور کامل برداشته شد (جزء پروتئینی S-1) و روی رسوب بافر استخراجی II (NaCl ۱ مولار، pH=۷) به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر ریخته شد. بعد از بهم زدن با ورتکس حدوداً در داخل این بافر انکوباسیون به مدت ۱۰ ساعت انجام گردید. سپس عمل سانتریفوژ همانند بالا انجام گردید. محلول روئی (سوپرناتانت) جمع شد (جزء پروتئینی S2)، آنگاه روی رسوب بافر استخراجیIII (۲ ٪ SDS، ۱۰٪ گلیسرول، ۶۲/۵ میلی مولار تریس- اسیدکلریدریک ۶/۸= PH) به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر ریخته شد. بعد از به هم زدن با ورتکس حدوداً به مدت ۴ ساعت در داخل این بافر انکوباسیون انجام گردید. سپس عمل سانتریفوژ با روش فوق انجام گردید. محلول روئی جمع شده و جزء پروتئینی S3 برای هر بذر بدست آمد. بعد از هر مرحله استخراج نمونه های پروتئین در دمای $-20^{\circ}C$ در فریزر نگهداری شد.

انجام الکتروفورز

از تکنیک الکتروفورز یک بعدی با ژل اکریل آمید حاوی سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE) استفاده شد. الکتروفورز به Laemmli (1970) با اعمال تغییرات اندکی در حجم مواد صورت گرفت.

در این پژوهش ژل‌هائی به ابعاد ۲×۱۳۰×۱۶۰ میلی‌متر تهیه شد. غلظت ژل درزگیر و ژل اصلی ۱۰٪ و غلظت ژل بالائی ۵٪ انتخاب گردید.

نمونه‌گذاری

برای نمونه‌گذاری ۵ میکرولیتر از عصاره پروتئینی به همراه ۳/۷۵ میکرولیتر محلول PBP و ۱/۲۵ میکرولیتر، ۲-مرکاپتواتانول به داخل لوله‌های اپندرف ریخته می‌شد (Valizadeh 2001). چون سه نوع استخراج مختلف وجود داشت (اجزاء S2,S1 و S3) و مقدار نمونه‌گذاری زیاد بود، مقادیر بالا در ۱۰ ضرب شد. یعنی برای عصاره پروتئینی۵۰ میکرولیتر، ۳۷/۵ میکرولیتر از محلول PBP

1. Supernatant

(۱۱) و ۱۲/۵میکرولیتر ۲- مرکاپتواتانول به کار رفت. لازم به توضیح است که در روی عصاره پروتئینی ۳۷/۵ میکرولیتر از محلول PBP از شب قبل ریخته شده و در طول شب اینها با هم کاملاً مخلوط شدند، ولی مرکاپتواتانول در زمان نمونه گذاری اضافه گردید.

با توجه به نتایج مشاهده شده متعدد، میزان تزریق از مخلوط حاصل (عصاره پروتئین + محلول PBP + ۲- مرکاپتواتانول) برای پروتئین‌های S1، ۵۵ میکرولیتر، برای پروتئین‌های S-2 ۷۰ میکرولیتر و برای پروتئین‌های S-3 ۶۰ میکرولیتر درون هر چاهک نمونه‌گذاری شد. لازم به ذکر است که برای نمونه‌های S-1 از مرکاپتواتانول استفاده نشد (Krochko et al. 2000).

راه اندازی الکتروفورز

پس از اتمام عمل نمونه گذاری، دستگاه الکتروفورز به آرامی به داخل یخچال منتقل شده و به منبع برق وصل گردید. پس از روشن کردن منبع آمپراژ به طور ثابت تنظیم گردید. این مقدار برای پروتئین‌هایS1، ۲۰ میلی‌آمپر و برای پروتئین‌های S2 و S3، ۱۸ میلی‌آمپر به طور ثابت لحاظ گردید.

تجزیه و تحلیل داده ها

الگوهای پروتئینی S1، S2 و S3 برای سه جمعیت یونجه بصورت یک (وجود نوار پروتئینی) و صفر (عدم وجود نوار پروتئینی) امتیازدهی و ماتریس شباهت بین افراد برای الگوهای پروتئینی S1، S2 و S3 و پروتئین کل (هر سه الگوی پروتئینی بطور یکجا) برای سه جمعیت بر اساس ضرایب شباهت تطابق ساده محاسبه شد (۱۶) و گروه‌بندی افراد با تبدیل ضرایب شباهت به دندروگرام با کمک نرم‌افزار NTSYS-PC2.02 و روش تجزیه خوشه‌ای *UPGMA* انجام شد. میانگین فاصله هر فرد با سایر افراد محاسبه شد و حدود اطمینان میانگین هر جمعیت از فرمول $t \times S\overline{X}$ ٪۵ بدست آمد ($S\overline{X} = \sqrt{S2/n}$). عدد t از جدول دوطرفه t در سطح احتمال ۵٪ استخراج گردید.

نتایج و بحث

الکتروفورز پروتئین‌ها

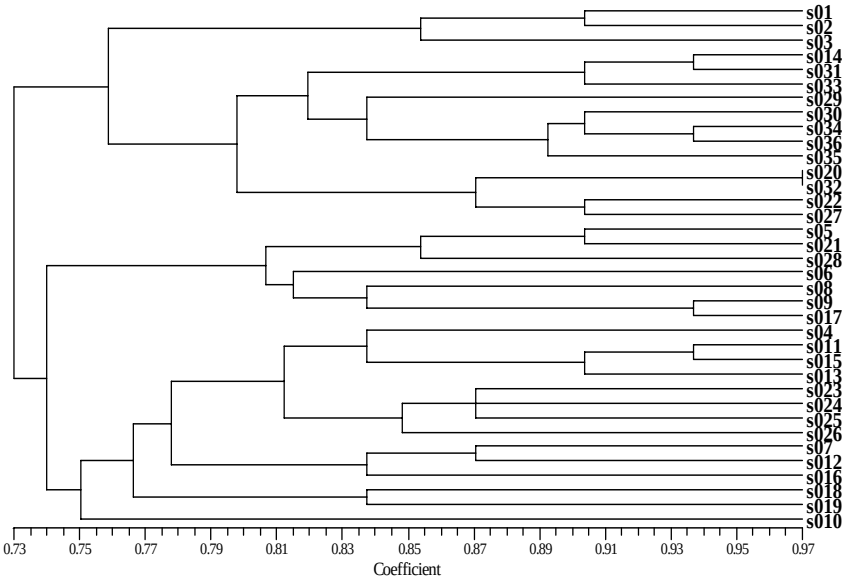
پروتئین‌های S1

حدود ۳۰ نوار پروتئینی بدون ابهام در این جزء مشاهده شد.پس از ثبت رکوردهای صفر (برای عدم حضور نوار) و یک (برای حضور نوار) برای تک بذرها در هر جمعیت و تشکیل ماتریس صفر و یک، معیار ضریب تطابق ساده بعنوان معیار شباهت افراد محاسبه شد. میانگین شباهت افراد در سه جمعیت برای پروتئین‌های S1 برابر ۰/۷۶ (یا فاصله ژنتیکی ۰/۲۴) بود. دامنه تغییرات برای قره‌یونجه بین ۰/۷۰ الی ۰/۷۹، برای سنتتیک یک بین ۰/۶۸ الی ۰/۷۹ و برای سنتتیک دو بین ۰/۷۱ الی ۰/۸۴ بود. میانگین فاصله افراد برای قره‌یونجه ۰/۲۵۵ و برای سنتتیک یک و سنتتیک دو به ترتیب ۰/۲۴۸ و ۰/۲۱۶ بدست آمد. با بررسی میانگین فاصله افراد در هر جمعیت مشخص می شود که دو رقم قره‌یونجه و سنتتیک یک از لحاظ پروتئین‌های S1 نسبت به هم اختلاف ندارند، در حالیکه در هر دو رقم میانگین فاصله درون جمعیتی از میانگین فاصله ژنتیکی سنتتیک دو بیشتر است. به عبارت دیگر در جمعیت سنتتیک دو شباهت افراد بطور معنی‌داری بیشتر از دو جمعیت دیگر است.

نتایج برش دندروگرام‌ها بر اساس دو روش متفاوت در جدول ۱ آمده است. دندروگرام حاصل از پروتئین‌های ذخیره‌ای S1 بعنوان نمونه در جمعیت سنتتیک یک در شکل ۱ نشان‌داده شد. ملاحظه می‌شود که با برش دندروگرام در ۵۰٪ شباهت، تعداد گروه بدست آمده در جمعیت‌های سنتتیک یک برابر ۱۸، قره‌یونجه برابر ۱۲ و در جمعیت سنتتیک دو برابر ۱۱ بوده است و جمعیت اخیر با داشتن کمترین گروه در منطقه برش واجد تنوع کمتری بوده است. به همین ترتیب برش دندروگرام در جدول ۱ برای داشتن ۴ گروه (کلاستر) در جمعیت سنتتیک دو بیشترین ضریب شباهت (۰/۷۷) و لذا کمترین فاصله درون جمعیتی را به خود اختصاص داده است.

جدول۱- نتایج برش دندرو گرام های حاصل از تجزیه کلاستر پروتئین های S1 در سه جمعیت یونجه

روش	بر اساس $(n/2)^{\frac{1}{2}}$			بر اساس ۵۰ درصد شباهت		
جمعیت	قره‌یونجه، Syn_1 و Syn_2			قره‌یونجه، Syn_1 و Syn_2		
محل برش	۰/۷۶۵	۰/۷۶۰	۰/۷۷	۰/۸۴	۰/۸۵	۰/۸۴
تعداد کلاستر	۴	۴	۴	۱۲	۱۸	۱۱



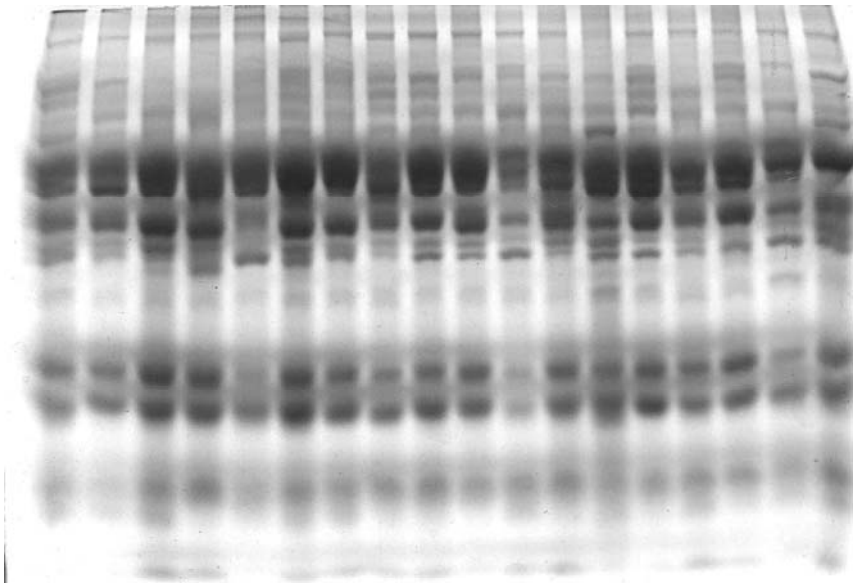
شکل۱- دندروگرام حاصل از پروتئین‌های ذخیره ای S1 درجمعیت سنتتیک یک الکترو فورز پروتئین های S2

الگوی نواربندی پروتئین‌های ذخیره‌ای جزء S2 برای جمعیت Syn_1 بعنوان مثال در شکل ۲ نشان داده شده است. حدود ۲۸ نوار پروتئینی بدون ابهام در این جزء مشاهده شد. پس از ثبت رکوردهای صفر و یک برای تک بذرها در هر جمعیت و تشکیل ماتریس داده‌ها، معیار ضریب تطابق ساده بعنوان معیار شباهت افراد محاسبه شد. میانگین شباهت افراد در سه جمعیت برای پروتئین‌های S2 برابر ۰/۷۰۴ (یا فاصله ژنتیکی ۰/۲۹۶) بود. دامنه تغییرات برای قره‌یونجه بین ۰/۵۷ الی ۰/۷۷، برای سنتتیک یک بین ۰/۶۰ الی ۰/۷۵ و برای سنتتیک دو بین ۰/۶۰ الی ۰/۸۰ بود. میانگین فاصله افراد برای قره‌یونجه ۰/۳۱۵ و برای سنتتیک یک و سنتتیک دو به ترتیب ۰/۳۱۱ و ۰/۲۶۴ بدست آمد. با بررسی میانگین فاصله افراد در هر جمعیت مشخص می‌شود که دو رقم قره‌یونجه و سنتتیک یک از لحاظ پروتئین‌های S2 نسبت به هم اختلاف ندارند، در حالیکه در هر دو رقم میانگین فاصله درون جمعیتی از میانگین فاصله ژنتیکی سنتتیک دو بیشتر است. به عبارت دیگر در جمعیت سنتتیک دو شباهت افراد بطور معنی‌داری بیشتر از دو جمعیت دیگر است. این نتیجه با یافته‌های حاصل از پروتئین‌های S1 همخوانی دارد. در واقع، پروتئین‌های ذخیره‌ای مهم می‌توانند از ژن‌های کاملاً محافظت شده بدست آیند. بطوریکه علی رغم وجود ۳۰ نوار پروتئینی در جزء S1 و ۲۸ نوار پروتئینی در جزء S2، افراد درون جمعیت‌ها از نظر فاصله ژنتیکی زیاد دور از هم نبودند و شباهت آنها بیشتر از فاصله شان بوده است.

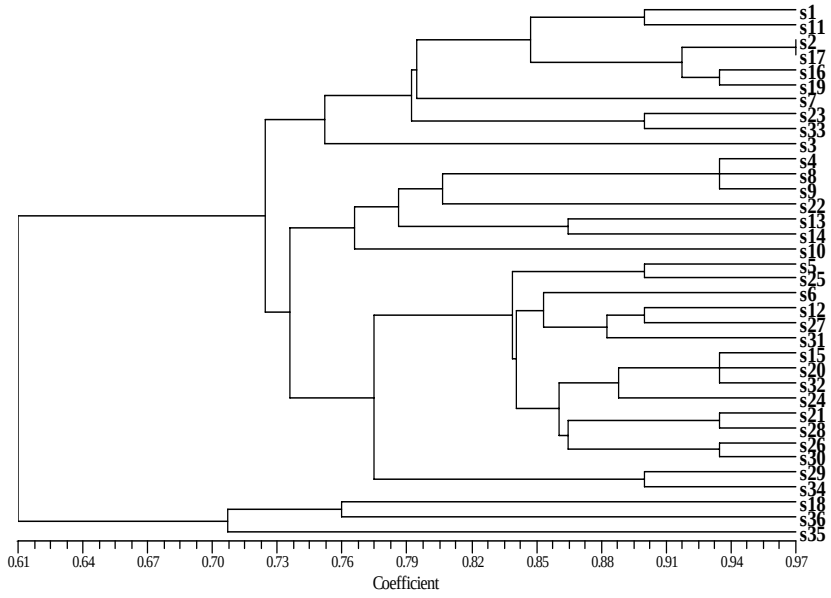
نتایج برش دندروگرام‌های سه جمعیت سنتتیک یک، قره‌یونجه و سنتتیک دو بر اساس دو روش در جدول ۲ آمده است. دندوگرام حاصل از پروتئین‌های ذخیره‌ای S2 بعنوان نمونه در جمعیت سنتتیک دو در شکل ۳ داده شد. ملاحظه می‌شود که با برش دندروگرام در ۵۰٪ شباهت تعداد گروه بدست آمده در جمعیت های سنتتیک ی‌ک و قره‌یونجه برابر ۱۲ و در جمعیت سنتتیک دو برابر ۱۰ بوده است و جمعیت اخیر با داشتن کمترین گروه در منطقه برش واجد تنوع کمتری بوده است. به همین ترتیب برش دندروگرام در جدول ۲ برای داشتن ۴ گروه (کلاستر) در جمعیت سنتتیک دو بیشترین ضریب شباهت (۰/۷۲۵) و لذا کمترین فاصله درون جمعیتی را به خود اختصاص داده است.

جدول ۲- نتایج برش دندروگرام های حاصل از تجزیه کلاستر پروتئین های S2 در سه جمعیت یونجه

روش	بر اساس $(n/2)^{\frac{1}{2}}$			بر اساس ۵۰ درصد شباهت		
جمعیت	قره‌یونجه، Syn_1 و Syn_2			قره‌یونجه، Syn_1 و Syn_2		
محل برش	۰/۶۵۷	۰/۶۹	۰/۷۲۵	۰/۷۷۵	۰/۸۰	۰/۷۹
تعداد کلاستر	۴	۴	۴	۱۲	۱۲	۱۰



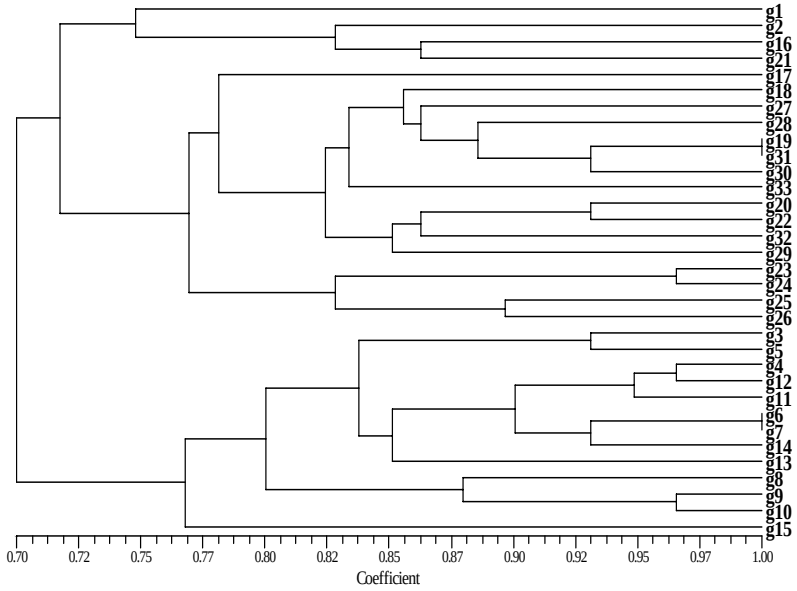
شکل ۲- الگوی نواربندی پروتئین‌های ذخیره‌ای تک بذر S2 جمعیت قره‌یونجه



شکل۳- دندروگرام حاصل از پروتئین‌های ذخیره‌ای S2 در جمعیت سنتتیک دو

الکترو فورز پروتئین‌های S3

حدود ۳۳ نوار پروتئینی بدون ابهام در این جزء مشاهده شد، ولی اکثر آنها مانند پروتئین‌های S1 و S2 در بین افراد چند شکلی روشن نشان نمی‌دهند. میانگین شباهت افراد در سه جمعیت برای پروتئین‌های S3 برابر ۰/۷۵ (یا فاصله ژنتیکی ۰/۲۵) بود. دامنه تغییرات برای قره‌یونجه بین ۰/۶۴ الی ۰/۸۳، برای سنتتیک یک بین ۰/۶۹ الی ۰/۷۹ و برای سنتتیک دو بین ۰/۶۹ الی ۰/۸۱ بود. میانگین فاصله افراد برای قره‌یونجه ۰/۲۵۵ و برای سنتتیک یک و سنتتیک دو به ترتیب ۰/۲۵۴ و ۰/۲۳۴ بدست آمد. با بررسی میانگین فاصله افراد در هر جمعیت مشخص می‌شود که دو رقم قره‌یونجه و سنتتیک یک از لحاظ پروتئین‌های S3 نسبت به هم اختلاف ندارند، در حالیکه در هر دو رقم میانگین فاصله درون جمعیتی از میانگین فاصله ژنتیکی سنتتیک دو بیشتر است. بعبارت دیگر در جمعیت سنتتیک دو شباهت افراد بطور معنی‌داری بیشتر از دو جمعیت دیگر است. این یافته‌ها با نتایج پروتئین‌های S1 و S2 هماهنگی دارد.



شکل۴- دندروگرام حاصل از پروتئین‌های ذخیره‌ای S3 در جمعیت قره‌یونجه

نتایج برش دندروگرام‌های سه جمعیت سنتتیک یک، قره‌یونجه و سنتتیک دو بر اساس دو روش متفاوت در جدول ۳ آمده است. دندروگرام حاصل از پروتئین‌های ذخیره‌ای S3 بعنوان نمونه در جمعیت قره‌یونجه در شکل ۴ نشان داده شد. ملاحظه می‌شود که با برش دندروگرام در ۵۰٪ شباهت تعداد گروه بدست آمده در جمعیت‌های سنتتیک یک برابر ۱۶، قره‌یونجه برابر ۱۳ و در جمعیت سنتتیک دو برابر ۱۰ بوده است و جمعیت اخیر با داشتن کمترین گروه در منطقه برش واجد تنوع کمتری بوده است. به همین ترتیب برش دندروگرام در جدول ۳ برای داشتن ۴ گروه (کلاستر) در جمعیت سنتتیک دو بیشترین ضریب شباهت (۰/۷۷۷) و لذا کمترین فاصله درون جمعیتی را به خود اختصاص داده است.

جدول۳- نتایج برش دندروگرام های حاصل از تجزیه کلاستر پروتئین‌های S3 در سه جمعیت یونجه

روش	بر اساس $(n/2)^{\frac{1}{2}}$			بر اساس ۵۰ درصد شباهت		
جمعیت	قره‌یونجه، Syn_1 و Syn_2			قره‌یونجه، Syn_1 و Syn_2		
محل برش	۰/۷۴۸	۰/۷۳۷	۰/۷۷۷	۰/۸۵	۰/۸۴	۰/۸۵
تعداد کلاستر	۴	۴	۴	۱۳	۱۶	۱۰

تجزیه و تحلیل پروتئین‌های S_1، S_2 و S_3 بطور همزمان (پروتئین کل):

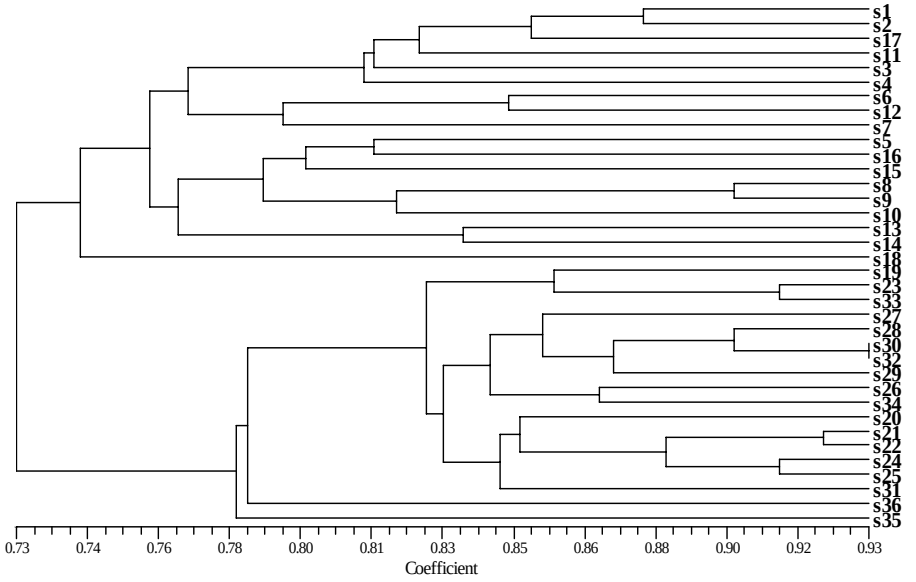
ماتریس داده‌ها برای تک بذرها در هر جمعیت برای پروتئین کل تشکیل شدو معیار ضریب تطابق ساده بعنوان معیار شباهت افراد محاسبه شد. میانگین شباهت افراد در سه جمعیت برای پروتئین کل برابر ۰/۷۳۶ (یا فاصله ژنتیکی ۰/۲۶۴) بود. دامنه تغییرات برای قره‌یونجه بین ۰/۶۸ الی ۰/۷۷، برای سنتتیک یک بین ۰/۶۸ الی ۰/۷۵ و برای سنتتیک دو بین ۰/۷۱ الی ۰/۷۹ بود. میانگین فاصله افراد برای قره‌یونجه ۰/۲۷۰ و برای سنتتیک یک و سنتتیک دو به ترتیب ۰/۲۷۴ و ۰/۲۵۱ بدست آمد. با بررسی میانگین فاصله افراد در هر جمعیت مشخص می شود که دو جمعیت قره‌یونجه و سنتتیک یک از لحاظ پروتئین کل نسبت به هم اختلاف معنی‌دار نداشتند و در هر دو جمعیت میانگین فاصله درون جمعیتی از میانگین فاصله ژنتیکی سنتتیک دو بیشتر است. بعبارت دیگر در جمعیت Syn2 شباهت افراد بطور معنی‌داری بیشتر از دو جمعیت دیگر است. نتایج برش دندروگرام‌های حاصل برای سه جمعیت در جدول ۴ آمده است. دندروگرام حاصل از پروتئین کل بعنوان نمونه در جمعیت سنتتیک دو در شکل ۵ نشان داده شد. ملاحظه می‌شود که با برش دندروگرام در ۵۰٪ شباهت تعداد گروه بدست آمده در جمعیت‌های سنتتیک یک برابر ۱۷، قره‌یونجه برابر ۱۱ و جمعیت

سنتتیک دو برابر ۱۷ بوده است. بنابراین جمعیت قره‌یونجه با داشتن کمترین گروه در منطقه برش واجد تنوع کمتری بوده است. به همین ترتیب برش دندروگرام در جدول ۴ برای داشتن ۴ گروه (کلاستر) در جمعیت سنتتیک دو بیشترین ضریب شباهت (۰/۷۵۷) و لذا کمترین فاصله درون جمعیتی را به خود اختصاص داده است.

Valizadeh (1997) برای ارزیابی فاصله ژنتیکی ۹ گونه از گیاه یونجه، پروتئین‌های ذخیره‌ای محلول در نمک بذر، برگ و کلروپلاست را با توجه به خود گشن بودن اکثر آنها، بوسیله SDS–PAGE مورد بررسی قرار داد. در این مطالعه ۶۸ نوار بدون ابهام و تکرارپذیری مشاهده شد که از آنها برای برآورد فاصله ژنتیکی گونه‌های یونجه استفاده شد. گونه‌ها در فاصله ۰/۴-۰/۱ خوشه‌بندی شدند و میانگین فاصله ژنتیکی آنها ۰/۲۹۶ (شباهت ۰/۷۰۴) برآورده شده بود. نتایج حاصل از این گزارشات، با نتایج حاصل از این پژوهش در مورد پروتئین S_1، S_2، S_3 وکل‌پروتئین‌ها مطابقت داشت.

جدول۴- نتایج برش دندروگرام‌های حاصل از تجزیه کلاستر پروتئین‌های کل در سه جمعیت یونجه

روش	بر اساس $\left(\frac{n}{2}\right)^{\frac{1}{2}}$			بر اساس ۵۰ درصد شباهت	
جمعیت	قره‌یونجه Syn_1 و Syn_2			قره‌یونجه Syn_1 و Syn_2	
محل برش	۰/۷۲۳	۰/۷۴	۰/۷۵۷	۰/۷۹	۰/۷۹۵	۰/۸۳
تعداد کلاستر	۴	۴	۴	۱۱	۱۷	۱۷



شکل۵- دندروگرام حاصل از پروتئین کل در جمعیت سنتتیک دو

REFERENCES

1. Abdmishani, S. & Shahnejat Boushehri, A. A. (1999). *Advanced Plant Breeding*. (2nd Vol). University of Tehran. (In Farsi).
2. Karimi, H. (1997). *Fodder Crop Production and Breeding*. University of Tehran. (In Farsi).
3. Kidwell, K. K., Austin, D. F. & Osborn, T. C. (1994). RFLP evaluation of nine Medicago populations representing the original germplasm sources for north American alfalfa cultivars. *Crop Sci*, 34230-236. .
4. Krochko, J. E. & Bewly, J. D.(2000). Seed storage proteins of cultivars and subspecies of alfalfa. *Seed Science Research*, 10, 423- 430.
5. Krochko, J. E., Charbonneau, M. R., Coulter, K. M., Bowley, S. R. & Bewley, J. D. (1990). A comparison of seed storage proteins in subspecies and cultivars of *Medicago sativa*. *Canadian Journal of Botany*, 68, 940 -948.
6. Koleva, S. T., Marinova, E. I., Bojadjiev, M. I. & Samardjieva, K. G. (1992.) The globulin storage proteins legumin and alfin in alfalfa. *Seed Science and Technology*, 20, 483-488.
7. Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.

8. Li, Y., SU, J., Li, Y. J. & Su, J. K. (1990). Study on relationship of the local varieties of alfalfa. *Actaprata Culture Sinica*, 8, 37-41
9. Mclendon, M. E., Lanning, S. P., Mcguire, J. M. & Talbert, L. E. (1993). Variation of seed storage proteins within hard red spring wheat cultivars and effect on end-use properties. *Cereal Chem*, 70(5), 607-610.
10. Radic, H. (1998). Characterization of Spelt (*Triticum spelta*) forms by electrophoretic analyses of seed storage proteins. Comprative analyses of spelt and central European winter wheat cultivars by SDS-PAGE and A_PAGE. *Theor Appl Gene*, 91, 1340-1346.
11. Rezae, A. (1994). *Alfalfa Breeding*. University Publication Center (Markaze Nashr Daneshghahi), Tehran. (In Farsi).
12. Ronfort, J., Jenczwski, E., Bataillon, T. & Rousset, F. (1998). Analysis of population structure in autotetraplod species. *Genetics*, 150, 921-930.
13. Romesburg, H. C. (1990). *Cluster analysis for researchers*. Robert E. Krieger Publishing Co. Florida, USA.
14. Signor, C. L., Gallardo, K., Prosperi, J. M., Salon, C. & Quilien, L. (2005). Genetic diversity for seed protein composition in *Medicago truncatula*. *Plant Genetic Resouces*, 3 (1), 59-71.
15. Valizadeh, M. (2001).Seed storage protein profile of grain legumes grown in Iran, using SDS-PAGE. *Journal of Agricultural Science Technology*, 3, 287-292.
16. Valizadeh, M. (1997). Use of protein electrophoresis in evaluation of genetic distance between Medicago species. *Journal of Agricultural Science*, 28(2), 9-17. (In Farsi).
17. Xu. N., Coulter, K. M., Krochko, J. E. & Bewley, J. D. (1991). Morphological stages and storage protein accumulation in developing alfalfa (*Medicago sativa* L.) seeds. *Seed Science Research*, 1, 119-125.