مجله علوم کشاورزی ایران
جلد ۳۲، شماره ۳، سال ۱۳۸۰(۵۷۳-۵۶۷)

اثرنگاری پروتئینی جمعیت‌های گندم تائودار در ایران

علی اکبر شاه نجات بوشهری[۱] و سید محمد فخر طباطبایی[۲]
۱و۲- استادیار و عضو هیات علمی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران
تاریخ پذیرش مقاله ۸۰/۲/۵

خلاصه

روش معمول در تفکیک و ارزیابی جمعیت‌های یک گیاه، مقایسه تفاوت‌های موجود در طرز رویش افراد جمعیت در زمان‌ها و مکان‌های مختلف و توصیف ویژگیهای مرفولوژیکی و فلوریستیکی آن افراد در حین رویش است. ارزیابی مورفولوژیکی و فلوریستکی مذکور را می‌توان با مطالعه مستقیم ژنوم و تجزیه و تحلیل نشانگرهای بیوشیمیایی تکمیل نمود. پس از گروه‌بندی فلوریستیکی جمعیت‌های گندم وحشی تائودار ***Triticum thaoudar*** **Reut** در ایران (دسته بندی صد جمعیت در هفت گروه)، الگوی نواری پروتئین ذخیره بذر در افراد داخل هر جمعیت و نیز در جمعیت‌های هفت گروه مذکور مورد بررسی قرار گرفت و اثرنگاری پروتئینی گروه‌های مذکور تعیین گردید. در بررسی الگوهای الکتروفورزی، افراد داخل هر جمعیت الگوی نواری تقریباً مشابهی داشتند ولی الگوی نواری گروه‌ها کاملاً متفاوت بود. بر این اساس، شش اثر پروتئینی کاملاً بارز برای گروه‌های مذکور بدست آمد.

واژه‌های کلیدی: گندم وحشی، اثرنگاری پروتئینی، پروتئین ذخیره بذر.

مقدمه

تنوع ژنتیکی در افراد داخل یک جمعیت و یا جمعیت‌های مختلف یک گونه بیانگر وضعیت تکاملی آن گونه می‌باشد. بطور کلی بالا بودن تنوع ژنتیکی یک گونه امکان انجام برنامه‌های اصلاحی در آن گونه را بیشتر می‌کند. در روشهای معمولی اصلاحی با توصیف مرفولوژیکی و فلوریستکی نمونه‌های داخل یک گونه میزان تکامل و تنوع موجود در آن گونه قابل بررسی است. در روشهای معمول نمی‌توان صفات مرفولوژیکی و فلوریستیکی زیادی را بنا بر الگوی تنوع ژنتیکی مطالعه کرد. صفاتی که از نظر تولید اهمیت به سزایی دارند به شدت تحت تاثیر محیط و اثر متقابل ژنوتیپ و محیط می‌باشند. در واقع این صفات بسیار پیچیده‌اند و بررسی آنها نیاز به آزمونهای مکرر دارد. با استفاده از تجزیه و تحلیل نشانگرهای جدید بیوشیمیایی و مطالعه مستقیم ژنوم‌ها می‌توان مطالعه تنوع مرفولوژیکی و فلوریستکی معمول را تایید و یا تکمیل کرد (۵).

بکارگیری نشانگرهای بیوشیمیایی در توصیف و تفکیک جمعیت‌ها ایده جدیدی نیست. بولتر و همکاران(۲) کاربرد الگوهای نواری پروتئین را در سیستماتیک گیاهی مورد بررسی قرار دادند. لادیزینسکی و هیموویتز(۱۰) با نگاهی جدیدتر به بررسی الکتروفورز پروتئین بذر در مطالعات گیاه شناسی و تکامل پرداختند و به برخی از مزایای الگوی نواری پروتئین‌از جمله ثبات پروتئین‌های ذخیره‌ای اشاره نمودند. گاردینر و فورد،(۴) از طریق الکتروفورز پروتئین بذر، ارقام مرتعی را شناسایی کردند. کرافورد (۳)، از الکتروفورز پروتئین ذخیره به عنوان روشی مطمئن یاد کرد که به وسیله آن می‌توان روابط گونه‌ها را تعیین کرد. به هر حال روش‌های الکتروفورز پروتئین تا امروز پویایی خود را در تشخیص‌ها تداوم داده است (۸ و ۹).

از آنجا که گندم دیپلوئید وحشی تائودار به عنوان مبنای

مکاتبه کننده: علی اکبر شاه نجات بوشهری

تکامل گندم زراعی از جنبه‌های مختلف بیوشیمیایی و فلوریستکی نیازمند بررسی است، لذا در این تحقیق به عنوان یک اقدام پایه‌ای نسبت به تهیه اثرنگاری پروتئینی جمعیت‌های گندم تائودار پراکنده در کشور مبادرت گردید.

مواد و روشها

در جریان یک بررسی حدوداً سه ساله (۱۳۷۶-۱۳۷۴) که بر روی صد رویشگاه گندم تائودار در غرب و شمال غرب ایران انجام گرفت، هفت گروه فلوریستیکی در بین جمعیت‌های این گیاه مشخص شدند (شکل و جدول ۱). به منظور مطالعه میزان تشابه الگوی نواری پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر، در ابتدای بررسی، نوار بندی پروتئینی افراد داخل رویشگاه‌ها بطور انفرادی با یکدیگر مقایسه گردیدند. در مرحله بعدی، در هر یک از گروه‌های هفت گانه فوق‌الذکر، پروتئین بذر سه رویشگاه با هم مخلوط و الگوی نواری مخلوط‌های سه تایی در هفت گروه مورد مقایسه قرار گرفتند.

استخراج پروتئین به روش تغییر یافته لاملی(۱۱) انجام شد. بذرها پس از آرد شدن در بافر استخراج کننده (۲۰ میلی‌گرم در لیتر) قرار گرفتند، ترکیبات مورد استفاده عبارت بودند از: بافر استخراج کننده [حاوی بافر با pH=۶/۸: ۳۷/۵ میلی‌لیتر (۶/۰۵ گرم تریس[1] در ۳۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر)، سدیم دودسیل سولفات[2]: ۱۲ گرم، کوماسی بلوآر[3] ۲۵۰: ۵۰ میلی‌گرم و گلیسرول[4] : ۶۰ میلی‌لیتر و آب مقطر: ۷۲/۳ میلی‌لیتر]، بافر الکترود[5] [شامل گلایسین[6] ۱/۴۴ درصد، تریس ۰/۳ درصد و سدیم دودسیل سولفات ۰/۱ درصد]، محلول رنگ کننده [شامل تری کلریک اسید[7] ۶ درصد، اسید استیک خالص ۸/۷۵ درصد، کوماسی بلوآر ۲۵۰، ۰/۰۴ درصد و متانول ۲۵ درصد] و محلول رنگ بر [شامل تری کلریک اسید ۱۰ درصد]. الکتروفورز با جریان ثابت و تا رسیدن نشانه رنگی به پایین ژل ادامه یافت. پس از حذف ژل بالایی، رنگ‌آمیزی در طول شب انجام و سپس ژل در محلول رنگ برقرار گرفت.

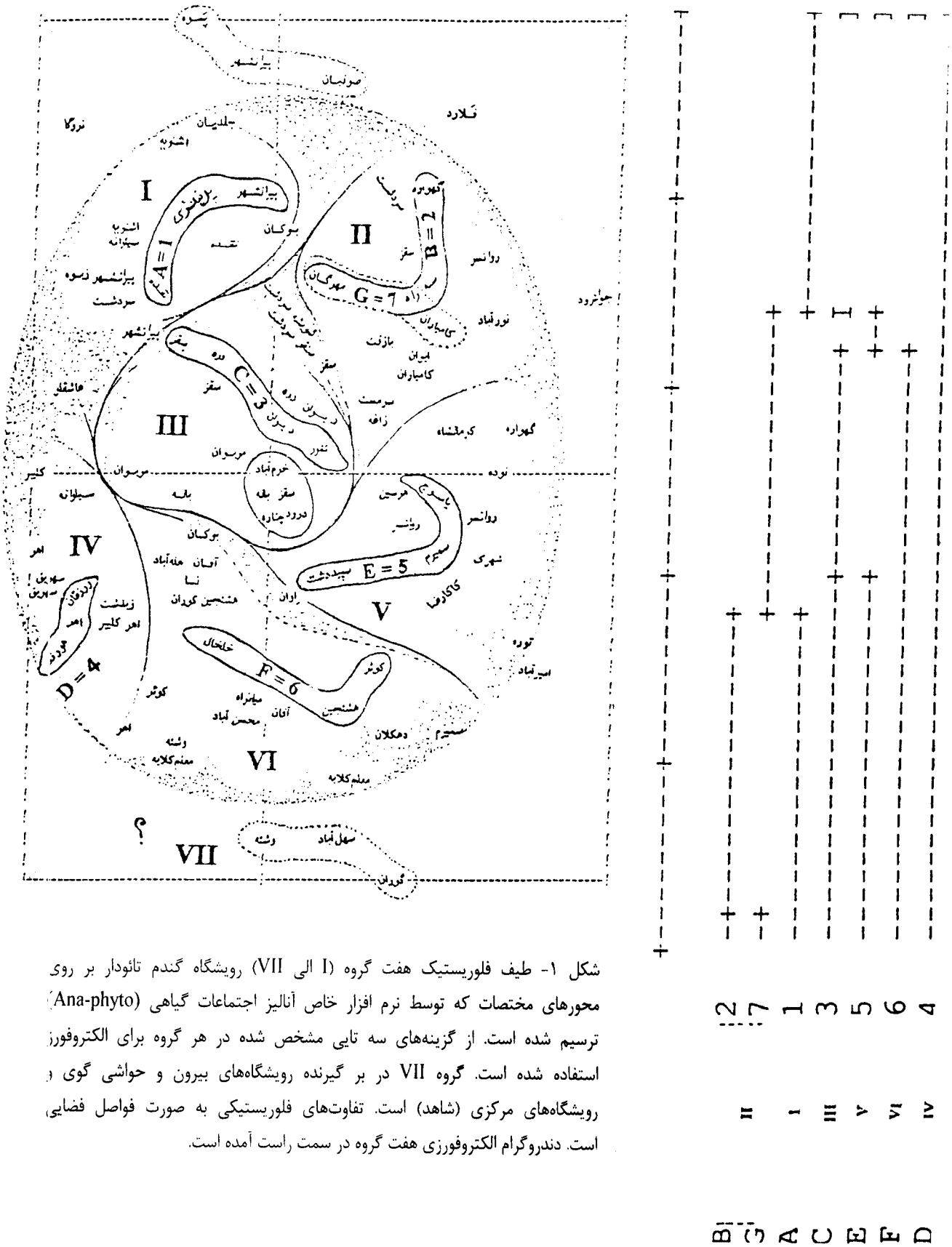
بر اساس روش جاکارد (۶) برای تجزیه داده‌های الکتروفورزی، هر یک از نوارهای الکتروفورزی به عنوان یک صفت در نظر گرفته شد و حضور و عدم حضور آنها به ترتیب با اعداد یک و صفر نمایش و در ماتریس دودویی[8] وارد گردید. برای محاسبه ضرایب تشابه از مقایسه روجهای فنوتیپی مبتنی بر فرآورده‌های پلی مورفیک منحصر بفرد و مشترک ژنوتیپ‌ها استفاده شد (۶). ضرایب تشابه جاکارد ذکر شده برای ترسیم دندروگرام بر اساس UPGMA [9] به کار رفت. این روش، شباهت بین جفت‌های مختلف ژنوتیپی را از فرمول Sij=a/(a+b+c) محاسبه می‌کند. در فرمول مذکور، a بیانگر تعداد حالات یک ـ یک ، b+c تعداد حالات صفر ـ یک و یک ـ صفر است. در فرمول جاکارد، بر خلاف ضریب تطابق ساده، تعداد حالات صفر ـ صفر در نظر گرفته نمی‌شود.

نتایج و بحث

چنانچه در شکل ۱ مشاهده می‌شود، صد زیستگاهی که در هفت گروه فلوریستیکی توزیع شده‌اند، از یک ترتیب دقیق جغرافیایی برخوردار نمی‌باشند. با این وجود، در هر گروه بیشتر زیستگاهها متعلق به محدوده جغرافیایی معین هستند. به طور کلی می‌توان گفت که در هر گروه زیستگاه‌های مشابهی جای دارند که ترکیب گونه‌ای آنها به هم نزدیکتر است. در بررسی الگوهای الکتروفورزی، افراد داخل هر گروه الگوی پروتئینی تقریباً مشابهی داشتند (شکل ۲). ولی الگوهای نواری مربوط به گروه‌های هفتگانه فلوریستیک به طور کلی از یکدیگر متفاوت بودند. به طوری که هفت گروه مذکور، شش اثر پروتئینی بارز و مشخص ارائه دادند (شکل ۳).

در مطالعه الگوهای نواری پروتئین کل بذر، فقط نوارهای حاوی وزن مولکولی بالا تا متوسط مورد استفاده قرار گرفت (۴۵ نوار). به جز گروه فلوریستیکی ۲ و ۷ که در یک گروه واقع شدند، بقیه گروه‌ها هر یک دسته متفاوتی را بخود اختصاص دادند (شکل ۱). بطور متوسط تعداد نوار در گروه معادل ۶/۴۲ و

1 . Tris
2 . Sodium Dodecyl Sulfate
3 . Commassie blue R-250
4 . Glycerol
5 . Electrode buffer
6 . Glycine
7 . Trichloric acetic acid
8 . Binary matrix
9 . Unweighted Paired Group Method Arithmetic Average



شکل ۱- طیف فلوریستیک هفت گروه (I الی VII) رویشگاه گندم تائودار بر روی محورهای مختصات که توسط نرم افزار خاص آنالیز اجتماعات گیاهی (Ana-phyto) ترسیم شده است. از گزینه‌های سه تایی مشخص شده در هر گروه برای الکتروفورز استفاده شده است. گروه VII در بر گیرنده رویشگاه‌های بیرون و حواشی گوی و رویشگاه‌های مرکزی (شاهد) است. تفاوت‌های فلوریستیکی به صورت فواصل فضایی است. دندروگرام الکتروفورزی هفت گروه در سمت راست آمده است.

جدول ۱- رویشگاه‌های هفت‌گانه گندم تائودار

بیرونی	پسوه – پیرانشهر (۱) – صوفیان (۱) – نروگا – فلارد
I	جلدیان – اشنویه (۱) – اشنویه (۲) – سلوانه (۱) – زیوه – پیرانشهر (۳) – نقده (۱) – پل فلزی (سردشت به بانه) – نقده (۲) – سردشت (۱) – پیرانشهر (۴)
مرزی	بوکان (۱)
II	سردشت (۲) – سقز (۱) – گهواره (۱) – سه راهه – مهرگان – کامیاران (۱) – کامیاران (۲) – نورآباد – روانسر (۱) – ایوان – سرمست – زاغه – بازفت – جوانرود.
مرزی	سقز(۲) – سنقر – سردشت (۳) – سردشت (۴) – شویسه
III	دیوان دره (۱) – دیوان دره (۲) – تنور – سقز (۳) – سقز (۴) – بانه – مریوان (۱) – مریوان (۲) – بوکان (۲)
مرکزی	خرم آباد (ملاوی) سقز (شهر) – بانه (حومه) درود – چناره
IV	عاشقلو – کلیبر (۱) – سیلوانه (۲) – سهریق (۱) – سهریق (۲) – اهر (۱) – اهر (۲) – ورزقان – هوراند - کلیبر (۲) – اهر (۳) – اهر (۴)
V	گهواره (۲) – کرمانشاه – روانسر (۲) – روانسر (۳) – هرسین – کاکارضا – نوده – شهرک – توره –امیر آباد – سپیددشت – سمیرم (۱) – یاسوج – سمیرم (۲)
مرزی	اوان
VI	آفاق (۱) – آفاق (۲) – هله آباد (۱) – هله آباد (۲) – هشتجین (۱) – هشتجین – خلخال – کوثر (۱) – میانراه – دهکلان
VIII	نسا – گوران (۱) – زیدشت – محسن آباد – وشته (۱) – معلم کلایه (۱) – معلم کلایه (۲) – کوثر (۲)
بیرونی	وشته (۲) – سهل آباد – گوران (۲)

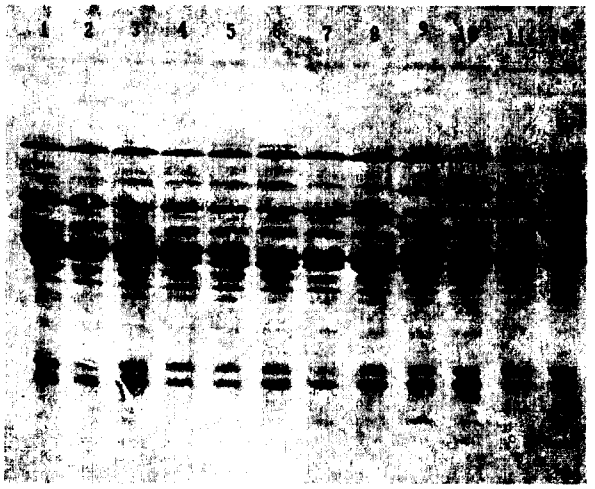
کمترین تعداد متعلق به گروه ۵ بود. محاسبه ضرایب تشابه در روش جاکارد با میانگین ۰/۴۸۵ و با دامنه تغییری از ۰/۱۸۲ تا ۱ نشان داد که بیشترین تشابه بین گروه‌های ۲ و ۷ و کمترین تشابه بین زوجهای ۲ با ۴، ۴ با ۶ و ۴ با ۷ دیده شد (جدول ۲).

استفاده از الگوهای نواری پروتئینی در مطالعات سیستماتیک، بر این فرض استوار است که پروتئین جمعیت‌های مختلف در صورت داشتن حرکت یکسان در داخل ژل، با هم مشابهند و پس از رنگ‌آمیزی نوارهایی با عرض و شدت یکسان تولید می‌کنند. بدین صورت که هر یک از نوارها به عنوان یک صفت در نظر گرفته می‌شود. فرض بر این است که پروتئین‌ها فرآورده های نسبتاً مستقیم ژن می‌باشند. بنابراین تفاوت در الگوی پروتئینی، نمایانگر اختلافات وراثتی معنی‌دار در بین جمعیت‌های مورد مقایسه است (۱). این تحقیق توانست، شش اثر پروتئینی واقعی موجود در هفت گروه فلوریستیکی را بنحو بارزی آشکار نماید. همانطور که در پرتره فلوریستیک مشخص است (شکل ۱)، گروه VII دسته بلاتکلیفی است که در خارج از گوی واقع شده و عناصر متشکله آن افرادی هستند که در حواشی و یا خارج از چهارچوب اصلی قرار دارند و انطباق آن به طور تصادفی با یکی از گروه‌های شش گانه دیگر کاملاً بدیهی است و طبعاً نمی‌تواند اثر پروتئینی مستقلی را به خود اختصاص دهد. به طوری که می‌توان این گروه تقریباً ده درصدی را حذف نمود. لازم به توضیح است که رویت نوار سایر ژنوم‌ها در جمعیت‌های مورد مطالعه حکایت از اختلاط این جوامع دارد. از آنجا که با ارزش‌ترین نتایج ناشی از الکتروفورز پروتئین در مورد غلات خویشاوند گندم است بنابراین تحقیق حاضر و آتی می‌تواند بار دیگر بر این امر صحه گذارد. تحقیقاتی که در آنها از الگوی پروتئین ذخیره در تشخیص‌ها استفاده شده است بسیار زیاد است. در مورد جنس‌های یولاف[1]، فستوک[2]،

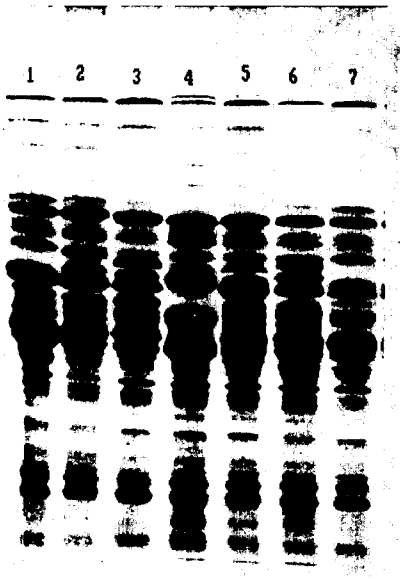
1 . Avena
2 . Festuca

جدول۳- ماتریس تشابه هفت گروه فلوریستیکی گندم تائودار بر مبنای ضرایب جاکارد در داده‌های حاصل از الگوهای نواری پروتئین‌های ذخیره

گروه‌ها	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷
۱							
۲	۰/۷۵۰						
۳	۰/۴۴۴	۰/۶۲۵					
۴	۰/۳۰۰	۰/۱۸۲	۰/۲۰۰				
۵	۰/۴۴۴	۰/۴۴۴	۰/۷۱۴	۰/۳۳			
۶	۰/۴۰۰	۰/۵۵۶	۰/۶۲۵	۰/۱۸۲	۰/۴۴۴		
۷	۰/۷۵۰	۱	۰/۶۲۵	۰/۱۸۲	۰/۴۴۴	۰/۵۵۶	



شکل ۲- نمونه‌ای از الگوی پروتئینی داخل جمعیتی



شکل ۳- شش اثر انگشت پروتئینی برای هفت گروه فلوریستیکی (۲ و ۷ طیف یکسانی دارند)

پنی ستوم[1]، ساکاروم[2]، تریپساکوم[3] و ذرت[4] هر کدام یک گزارش وجود دارد که به ترتیب در آنها ۹، ۳۶، ۱۵۰، ۱۰، ۵۱ و ۳۹۷ نمونه شناسایی شده است. در خصوص جنس هوردئوم[5] چهارگزارش و بطور متوسط ۱۹ نمونه، جنس لولیوم[6] دو گزارش و بطور متوسط ۱۱ نمونه، چاودار[7] سه گزارش و متوسط ۲۶ نمونه و تریتیکوم[8] ده گزارش و متوسط ۱۵۴ نمونه مورد بررسی و شناسایی قرار گرفته است (۵).

گسترده‌ترین تکنیک برای توصیف بیوشیمیایی جمعیت‌های گیاهی، روش‌های الکتروفورز پروتئین است (۵). کاربرد این روشها نسبت به سایرین در جوامع گیاهی بسیار بیشتر است. برای این منظور هم پروتئین‌های آنزیمی و هم غیر آنزیمی استفاده شده‌اند. روشهای الکتروفورزی موجود بسیار متنوع و گوناگون می‌باشد و مزیت بارز آنها ارزانی و سریع بودن آنهاست. پروتئین‌های ذخیره ضمن داشتن پلی مورفیسم زیاد بسیار با ثبات‌اند. در بذرهای رسیده عوامل محیطی بر آنها بی تاثیر و یا تاثیر اندکی دارند. فاکتورهای محیطی هر چند بر مقدار پروتئین ذخیره اثر می‌گذارند ولی بر حضور آنها در بذرهای رسیده بی تاثیر و یا کم تاثیرند. بنابراین الگوهای الکتروفورزی پروتئین ذخیره بذر به تنهایی یا با سایر نشانگرها معیار بسیار خوبی برای شناسایی جمعیت‌های گیاهی و ارقام خواهد بود (۷).

در مجموع می‌توان چنین نتیجه گرفت که به کارگیری مکانیسم‌های متعدد در بررسی پلی‌مورفیسم، دریافت‌های قوی‌تری از ارتباط ژنوم‌ها در اختیار قرار می‌دهد. الکتروفورز پروتئین‌ها طبق بررسیها روش بسیار مطمئنی است (۱۰) و تصویر دقیق‌تری را از وضعیت ژنوم‌ها ارائه می‌دهد.

---

1 . Pennisetum
2 . Saccharum
3 . Tripsacum
4 . Zea
5 . Hordeum
6 . Lolium
7 . Secale
8 . Triticum

REFERENCES مراجع مورد استفاده

۱.رحیمی نژاد، م. ۱۳۷۸. سیستماتیک مولکولی گیاهی، انتشارات دانشگاه اصفهان ۴۸۷ صفحه.

2.Boulter, D., D. A. Thurman, and B. L. Turner. 1966. The use of disc electrophoresis of plant proteins in systematics. Taxon 15: 135-142.

3.Crawford, D. J. 1983. Phylogenetic and systematic inferences from electrophoretic studies. In: Isozymes in Plant genetics and breeding, Part A., Tanksley, S. D. and T. J. Orton, (eds). Elsevier, Amsterdam, pp. 257-287.

4.Gardiner, S. E, and M. B. Forde. 1988. Identification of cultivars and species of pasture legumes by sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis of seed proteins. Plant Var. Seeds, 1: 13-26.

5.Hayward, M. D., N. O. Bosemark, and I. Romagosa, 1993. Plant breeding, principles and prospects. Chapman and Hall. P: 550.

6.Jaccard, P. 1908. Nouvelles researchers sur la distribution florale. Bull Soc Vaud Sci Nat 44: 223-270.

7.Konarev. V. G. 1996. Theoretical basis of plant breeding, St-Petersburg. Vol. 1.

8.Labuschagne, M., and H. Maartens. 1999. The use of low molecular weight glutenin subunits to distinguish between cultivar with and without resistance to the Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia,* Plant Breeding 118: 91-92.

9.Labuschagne, M. T., H. Maartens, and A. M. Oberholster. 1998. A comparison of HMW-GS, LMW-GS and RAPD fingerprinting for cultivar identification of some South African wheat cultivars. South African Journal of Plant and Soil 15: 147-150.

10.Ladizinsky, G., and T. Hymowitz. 1979. Seed protein electrophoresis in taxonomic and evolutionary studies. Theor. Appl. Genet. 54: 145-157.

11. Laemmli, UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685.

Protein Fingerprinting of *Triticum Thaoudar* Reut Populations in Iran

A.A. SHAHNEJAT-BUSHEHRI[1] AND S.M. FAKHR TABATABAEI[2]

1,2- Assistant Professor and Faculty member, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran.

Accepted. April.25, 2001

SUMMARY

The general approach to characterization and evaluation of populations involves cultivation of sub samples followed by investigation of their morphological and floristic description. Morphological and floristic study of population variability may be supplemented and usually surpassed by more direct evaluation of the genome by means of the analysis of biochemical markers. These approaches were pursued, using a floristic classification in which the Iranian wheat populations (*Triticum thaoudar*) fell into seven different groups. Thereafter, intrapopulation and interpopulation seed storage protein banding patterns were analyzed. Banding patterns of intrapopulations were observed to be the same. However, those of interpopulations were completely different, seven groups showing six distinct protein fingerprintings.

Key words: Wheat, Protein fingerprinting, Seed storage protein.