استفاده از الکتروفورز پروتئین‌ها در ارزیابی فاصله ژنتیکی گونه‌های یونجه

مصطفی ولیزاده

دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

تاریخ پذیرش مقاله ۷۵/۱۲/۸

خلاصه

پروتئین‌های محلول در نمک و محلول در الکل بذر، برگ و کلروپلاست ۹ گونهٔ یونجه (Medicago spp) در الکتروفورز سدیم دود سیل سولفات ـ ژل پلی اکریلامید (SDS- PAGE) جداسازی و مورد مطالعه قرار گرفت. مجموعاً ٦٨ نوار بدون ابهام و تکرارپذیر مشاهده شدند که از آنها برای برآورد فاصله ژنتیکی گونه‌های یونجه استفاده شد. گونه‌ها در فاصله ۰/۱ تا ۰/۴ خوشه بندی شدند و میانگین فاصله ژنتیکی آنها ۰/۲۹٦ برآورد شد. با توجه به این که در روش مورد استفاده، فاصله ژنتیکی از صفر تا یک متغیر است، می توان نتیجه گرفت که فاصله ژنتیکی گونه‌های مورد مطالعه کمتر از شباهت ژنتیکی آنها (۰/۷۰۴=۰/۲۹٦ - ۱) است. تجزیه کلاستر ۹ گونه را به ۴ گروه تقسیم کرد: گروه ۱: M.sativa یا یونجه زراعی گروه، ۲: M.lupulina، گروه ۳: M.minima ، M.radiata و گروه ۴: M.scutellata , M.truncatula M. rigidula, M.orbicularis و M.littoralis دو گونهٔ اخیر کمترین فاصله ژنتیکی و گونه زراعی یونجه بیشترین فاصله ژنتیکی را نسبت به سایر گونه‌ها داشت. این نتایج با طبقه‌بندی کلاسیک جنس مدیکاگو تفاوت‌هائی نشان می‌دهد که در این مقاله مورد بحث قرار گرفته است .

واژه های کلیدی : الکتروفورز، SDS-PAGE، فاصله ژنتیکی ،گونه های یونجه

مقدمه

جنس Medicago از طایفه Trifoliae و خانواده Fabaceae بر اساس مطالعات لزینس و لزینس (۹) شامل ۵۵ گونه یکساله و چند ساله، دیپلوئید و تتراپلوئید با تعداد کروموزوم پایه x=۸ (یا x=۷) است. گونه‌های یکساله عمدتاً اتوگام و گونه‌های چند ساله الوگام هستند (۱۵). این جنس بومی نواحی نیمه گرمسیری و معتدل نیمکره شمالی دنیای قدیم است (۱). منشأ پیدایش مهمترین گونهٔ Medicago یعنی یونجه زراعی را مناطق ماوراء قفقاز و شمالغرب ایران ذکر می‌کنند(۹).

برخی از گونه‌ها از اهمیت زراعی و تجاری برخوردار نیستند ولی با توجه به مقاومت زیادی که در مقابل آفات و امراض از خود نشان می‌دهند و همچنین از نظر گیاهشناسی درجهٔ خویشاوندی نزدیکی با مهمترین گیاه‌علوفه‌ای یعنی یونجه زراعی رادارند(۱٦)،به عنوان یک منبع ژرم پلاسم بالقوهٔ مناسب در اصلاح یونجه محسوب می‌گردند. از آن گذشته، همهٔ آنها قادرند ازت هوا را تثبیت کنند و از برخی از آنها به طور موفقیت‌آمیزی در تناوب زراعی با غلات (لی فارمینگ)[1] استفاده شده است (۱۴) و بدین ترتیب این گونه‌ها از نظر محیط زیست به طور اعم و از نظر تناوب و اکولوژی زراعی بطور اخص از اهمیت بالایی برخوردارند.

تحقیقات زیادی در زمینه‌های سیتولوژی، ایزوزیم و RFLP[2] گونه‌های متعلق به جنس Medicago بویژه یونجهٔ زراعی انجام شده است (۴، ۷، ۱۳، ۱۸، ۲۰)، لکن بندرت تحقیقات همزمان

1 - ley farming

2 - restriction fragment length polymorphism

مقایسه‌ای در ارتباط با تغییرات ژنتیکی این‌گونه‌ها یا بخشی از آنها در دست است (۹ و ۲۸). اسمال (۲۲) ۵۵ گونه یونجه را با استفاده از ۷۵ صفت متداول (مورفولوژیک و کمیّ) مورد مقایسه و مطالعه قرار داده و نشان داده است که در طبقه‌بندی اخیر آنها (۹) تناقض‌هائی وجود دارد. بنابراین، بررسی این‌گونه‌ها با استفاده از روش‌های جدید بیوشیمیائی همزمان با صفات کمیّ بمنظور اندازه‌گیری درجه شباهت و فاصله ژنتیکی آنها نسبت به یونجه زراعی ضرورت دارد تا بتوان از نتایج حاصل در اصلاح یونجه زراعی سود جست و این تحقیق در همین راستا انجام گردید. یکی از روش‌های ارزان قیمت برای مطالعه مارکرهای پروتئینی در گیاهان روش SDS- PAGE می‌باشد که در دو حالت مستقیم (استخراج پروتئین و مطالعه دسته جمعی افراد بخصوص در گیاهان خودگشن) و غیرمستقیم (استخراج پروتئین و مطالعه انفرادی بوته‌ها بخصوص در گیاهان دگرگشن) کاربرد پیدا کرده است (۳).

مواد و روشها

۹ گونهٔ یونجه مورد مطالعه در گلخانه کشت گردید و از شاخ و برگ بدست آمده حداقل سه فرد در شرایط مشابه نمونه‌برداری و استخراج پروتئین بعمل آمد. تعداد شش گونه از مناطق شمالغرب کشور ایران جمع‌آوری وبراساس لزینس ولزینس (۹) تشخیص داده شد و به همراه سه گونه با منشاء استرالیائی که از طریق وزارت کشاورزی به کشور وارد شده بودند در این مطالعه استفاده شدند. جدول ۱ خصوصیات این گونه‌ها را با توجه به طبقه‌بندی لزنیس و لزنیس نشان می‌دهد .

استخراج پروتئین‌های محلول در نمک:

نیم گرم برگ رسیده در ۱ میلی‌لیتر از محلول استخراج (۵۰mM تریس ـ اسید کلریدریک pH۷/۵ و M ۰/۵ از NaCl و ۰/۱ % مرکاپتواتانول) در ۴°c عصاره‌گیری شد و پس از حدود یک ساعت در rpm ۱۲۰۰۰ بمدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید و مایع بدست آمده در ۲۰°c- تا زمان استفاده نگهداری شد(۶). برای استخراج پروتئین‌های محلول در نمک از بذر ۳۰ میلی‌گرم آرد حاصل از حداقل ۲۰ بذر در هاون‌های کوچک در ۱ میلی‌لیتر از محلول استخراج فوق قرار گرفت و در ۴°c بمدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. در طول این مدت برای شکسته شدن بافت‌ها و حلّ مناسب پروتئین‌های محلول، خمیرهٔ حاصل سه بار در ۲۰°c- منجمد گردید و دوباره ذوب شد (۱۲) و پس از سانتریفوژ کردن در ۲۰°c- نگهداری شد.

استخراج پروتئین‌های محلول در الکل:

یک گرم برگ یا ۴۰ میلی‌گرم بذر در ۱ میلی‌لیتر از محلول استخراج الکلی [(۵۵% ، ۲ - پروپانول، ۲% ، ۲- مرکاپتو اتانول و ۱mM از PMSF] (۱۰) خرد شد و در دمای ۸۰°c بمدت یکساعت قرار گرفت و سپس بمدت ۱۰ دقیقه در rpm ۱۲۰۰۰

جدول ۱ـ اسامی و خصوصیات گونه‌های Medicago *مورد مطالعه*

محل جمع‌آوری یا دریافت	بخش	زیرجنس	نام علمی
آذربایجان ایران	Orbiculares	Orbicularia	M. orbicularis
آذربایجان ایران	Hymenocarpos	Orbicularia	M. radiata
آذربایجان ایران	Leptospirae	Spirocarpos	M. minima
آذربایجان ایران	Pachyspirae	Spirocarpos	M. rigidula
استرالیا	Pachyspirae	Spirocarpos	M. littoralis
استرالیا	Pachyspirae	Spirocarpos	M. truncatula
استرالیا	Rotatae	Spirocarpos	M. scutellata
آذربایجان ایران	—	Lupularia	M. lupulina
آذربایجان ایران	Falcago	Medicago	M. sativa

سانتریفیوژ انجام و مایع استخراجی در ۴°c تا زمان استفاده نگهداری شد .(سانترفیوژ نوع رومیزی با لوله های اپندورف)

استخراج پروتئین‌های کلروپلاست:

کلروپلاست برگ‌ها بطور دسته‌جمعی از هر گونه با استفاده از متد پالمر (۱۳) در گرادیان غلظت ۲۰، ۴۵ و ۶۰ درصد از ساکارز جدا گردید و رسوب کلروپلاست‌ها در آخرین مرحله در حجم مناسبی از محلول استخراج نمکی قرار گرفت و پس از چند بار انجماد و ذوب پروتئین‌های محلول در نمک کلروپلاست از طریق سانتریفیوژ بدست آمد و در ۲۰°c- تا زمان استفاده نگهداری شد. لازم به یادآوری است که امکان استخراج انفرادی بذر (بخاطر کوچکی آن در اکثر گونه‌ها) و کلروپلاست (بخاطر مشکلات تکنیکی) نبود و در مورد برگ هم اختلافاتی در نوارهای مهم مشاهده نگردید. لذا نتایج دسته‌جمعی (یا مستقیم) مورد آنالیز قرار گرفت.

انجام الکتروفورز:

الکتروفورزSDS- PAGE یک بعدی بر اساس روش لایملی (۸) با استفاده از ژل پلی اکریلامید ۱۲٪ که در قالب ۰/۱cm × ۱۶ × ۱۶ ساخته شدند انجام گردید. نمونه‌های پروتئینی با اختلاط ۵ میکرولیتر مایع استخراج شده ۱/۲۵ از ۲ مرکاپتواتانول و ۳/۷۵ میکرولیتر رنگ تهیه شد. رنگ بکار رفته شامل ۰/۰۰۲ درصد آبی برومونفل درمحلول۰/۰۶۲۵M تریس ـ کلریدریک اسید (pH۶/۸) بودکه‌درآن ۱۰درصدگلیسرول و۲ درصد SDS اضافه شده بود (۶). برای پروتئین‌های محلول در الکل بخاطر سنگین‌تر کردن نمونه، مقادیر مربوط به مایع استخراج، مرکاپتواتانول‌ورنگ دو برابر شد. حداقل سه نمونه برای هر گونه به صورت دسته‌جمعی یا روش مستقیم برای استخراج پروتئین‌های ذخیره بذری و کلروپلاست بخاطر محدودیت تکنیکی (کوچک بودن بذر در اکثر یونجه‌ها و نیاز به ماده سبز زیاد در استخراج کلروپلاست) و به صورت انفرادی یا غیرمستقیم برای پروتئین برگها مورد تجزیه قرار گرفت. رنگ‌آمیزی پروتئین‌ها با نیترات نقره بر اساس روش سوتیزر و همکاران (۲۴) انجام گرفت.

تجزیه داده‌ها

ابتدا نوارها یا مارکرهای پروتئینی بسته به حضور یا عدم حضور نوار با کدهای ۱ و ۰ مشخص شدند سپس ماتریکس ضرایب فاصله ژنتیکی مستقیماً از ماتریکس داده‌ها به نسبت تعداد جفت‌های ۱ ـ ۰ به تعداد کل نوار محاسبه شد. این طرز محاسبه شاخص قابل مقایسه‌ای با استفاده از ضریب جفت وجور شدن ساده[1] برای ارزیابی فواصل ژنتیکی گونه‌ها بدست می‌دهد (۱۷). در این روش عدم وجود یک نوار به اندازهٔ وجود آن در تشکیل شباهت بین گونه‌ها و در نتیجه تشکیل فاصله ژنتیکی، شرکت می‌کند و دندروگرام براساس ضرایب فواصل ژنتیکی وبااستفاده‌ازUPGMA(۲۳)تشکیل‌گردید.

نتایج و بحث

نتایج مربوط به ۶۸ نوار بدون ابهام و بطور تکرارپذیر (حداقل در ۴ بار آزمایش) در برگها، دانه‌ها و کلروپلاست های ۹ گونه یونجه در جدول ۲ آمده است. برای سادگی هر نوار برحسب نسبت حرکت آن در ژل به مقدار حرکت آبی برومونفل (RF[2]) نامگذاری شد. وزن ملکولی برخی نوارها نیز با استفاده از پروتئین‌های استاندارد بکار رفته در موقع الکتروفورز مشخص گردید. حضور یک نوار با کد ۱ و عدم حضور ان با کد ۰ مشخص شد. همانطور که جدول ۲ نشان می‌دهد ۱۶ نوار در تمام گونه‌ها مشترک و ۵۲ نوار چند شکلی (پلی‌مورفیسم) دارند. نسبت این پلی مورفیسم در پروتئین‌های بذر تقریباً ۹۰ درصد (۲۷ نوار از ۳۰ نوار) ولی در پروتئین‌های برگ و کلروپلاست حدود ۶۶ درصد (۲۵ نوار از ۳۸ نوار) است. لذا با الکتروفورز SDS-PAGE ، امکان مطالعه تنوع ژنتیکی در سطح بذر یا دانه نیز فراهم شده است در حالی که با الکتروفورز ایزوزیم‌ها بخاطر عدم فعالیت اکثریت قریب به اتفاق ایزوزیم‌ها در بذر، این تنوع قابل مطالعه نیست و آنزیم‌ها پس از جوانه‌زنی بذر ، فعال و قابل تشخیص می‌شوند.

برای روشن شدن طرز نامگذاری نوارها و مشخص کردن RF آنها الگوی نواربندی برگ و بذر گونه‌های یونجه در شکل ۱ منعکس شده است. دیده می‌شود که علیرغم قراردادن حجم مساوی از نمونه پروتئینی، شدت رنگ‌آمیزی برای برخی نوارها در داخل یک گونه و گاهی بین گونه‌ها متفاوت است. برای ساده‌نمائی و حذف اثر موضع ژل، در این بررسی نوارها کمیّ نشده‌اند و نوارهای کاملاً واضح و تکرارپذیر فقط یکبار در صورت اشتراک در دو اندام

1 - Simple matching coefficieut

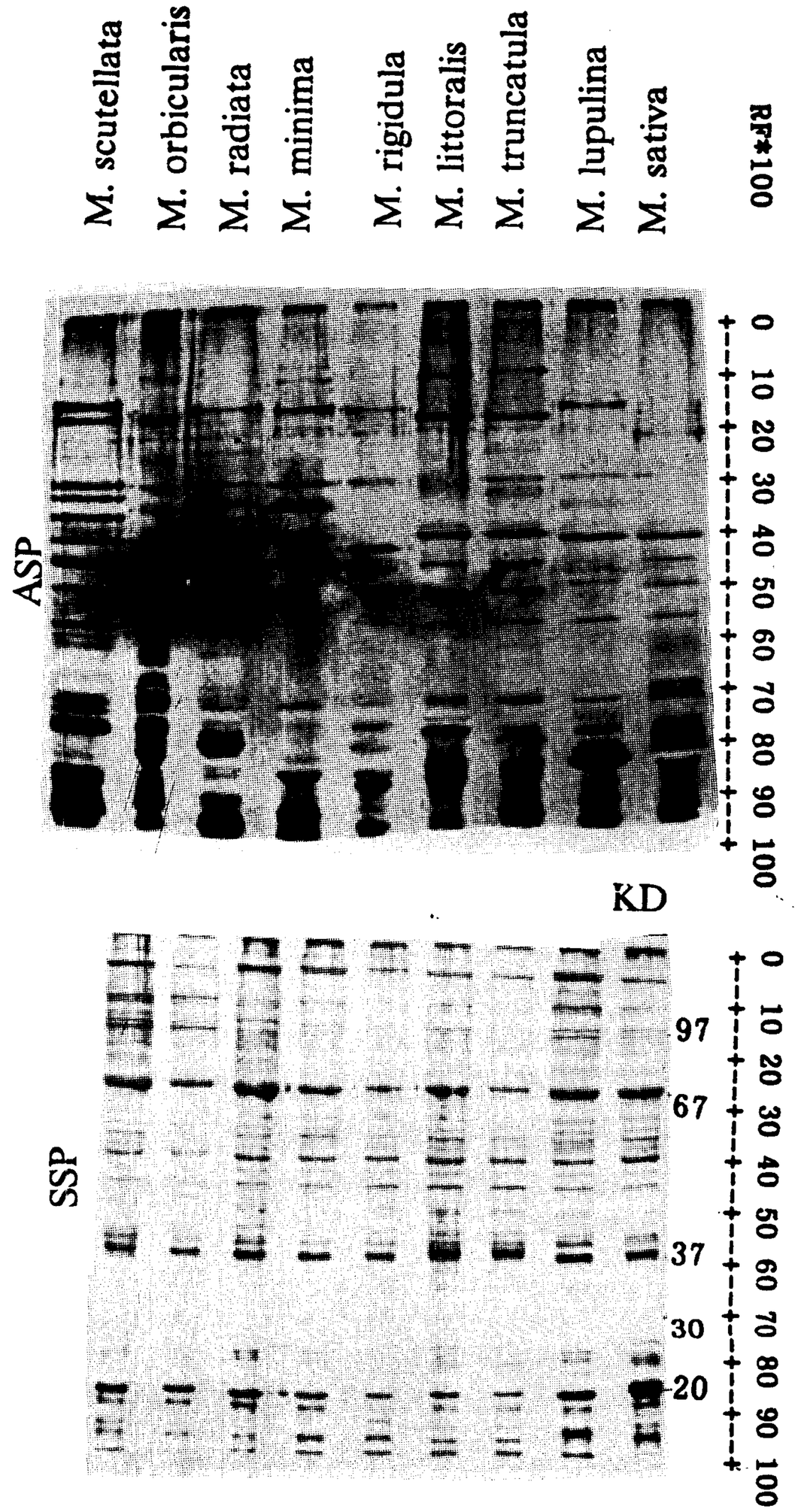
2- resolution factor

جدول ۲: مارکر پروتئینی (محلول در نمک و محلول در الکل) در اندامهای مختلف ۹گونه یونجه:

	پروتئینهای محلول در الکل									
		RF × 100	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹
برگ		۸	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
		۹	۱	۰	۰	۰	۱	۱	۱	۱	۱
		۱۷	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
		۱۸	۰	۰	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۰
		۳۵	۰	۰	۱	۱	۱	۰	۰	۰	۰
		۳۶	۱	۱	۰	۱	۱	۱	۱	۱	۱
		۳۷	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱
		۳۸	۰	۱	۱	۱	۱	۰	۱	۱	۱
		۴۶	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۰
		۵۰	۰	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰
		۵۴	۱	۰	۰	۰	۱	۱	۱	۰	۰
بذر		۲۱	۰	۰	۱	۱	۱	۰	۰	۱	۱
		۲۳	۱	۱	۰	۰	۱	۱	۱	۱	۰
		۲۴	۱	۰	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۰
		۲۵	۰	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
		۲۶	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
		۳۴	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۱	۱
		۳۶	۰	۰	۰	۰	۱	۱	۱	۱	۰
		۳۸	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۱	۰
		۳۹	۱	۱	۱	۱	۰	۰	۰	۰	۰
		۴۰	۰	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۱
		۴۹	۱	۱	۱	۰	۱	۱	۱	۱	۱
		۵۰	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰
		۵۱	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۱	۰	۰
		۵۲	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۰	۱	۱
		۸۵	۱	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰
		۹۰	۰	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
		۹۴	۰	۰	۰	۰	۱	۱	۱	۱	۰

۱=M.sativa
۲= M.orbicularis
۳= M.radiata
۴= M.minima
۵= M.rigidula
۶= M.littoralis
۷= M.truncatula
۸= M.scutellata
۹= M.lupulina

	پروتئینهای محلول در نمک									
		RF × 100	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹
برگ		۵	۱	۰	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
		۶	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
		۱۲	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
		۱۶	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
		۲۸	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
		۳۶	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
		۴۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
		۴۳	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
		۴۶	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
		۵۵	۰	۱	۰	۱	۱	۱	۱	۱	۰
		۵۹	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۱	۰	۰
		۶۰	۱	۱	۰	۱	۱	۰	۰	۱	۱
		۸۷	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
		۸۹	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
		۹۱	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
		۹۳	۰	۰	۰	۰	۱	۰	۰	۰	۰
		۹۴	۱	۰	۰	۰	۰	۱	۱	۱	۰
		۹۵	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱
		۹۶	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۰	۱	۰
بذر		۱۴	۰	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰
		۱۵	۱	۰	۰	۰	۱	۰	۱	۰	۱
		۳۰	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
		۳۳	۰	۰	۰	۱	۱	۰	۰	۰	۰
		۵۴	۱	۰	۰	۱	۱	۱	۰	۰	۰
		۵۶	۰	۰	۱	۱	۰	۰	۰	۱	۱
		۵۹	۰	۱	۰	۰	۱	۱	۱	۱	۰
		۶۶	۱	۱	۰	۰	۱	۱	۱	۱	۱
		۶۹	۱	۱	۱	۰	۱	۱	۱	۱	۰
		۷۴	۰	۱	۰	۱	۱	۱	۱	۱	۱
		۷۶	۱	۱	۱	۱	۰	۱	۱	۱	۱
		۸۳	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
		۹۰	۰	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
کلروپلاست		۳۸	۰	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
		۴۰	۱	۰	۱	۱	۰	۰	۰	۰	۰
		۵۸	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
		۶۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
		۶۵	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
		۶۶	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۱	۱	۰
		۶۷	۱	۱	۱	۰	۰	۱	۱	۰	۱
		۷۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱



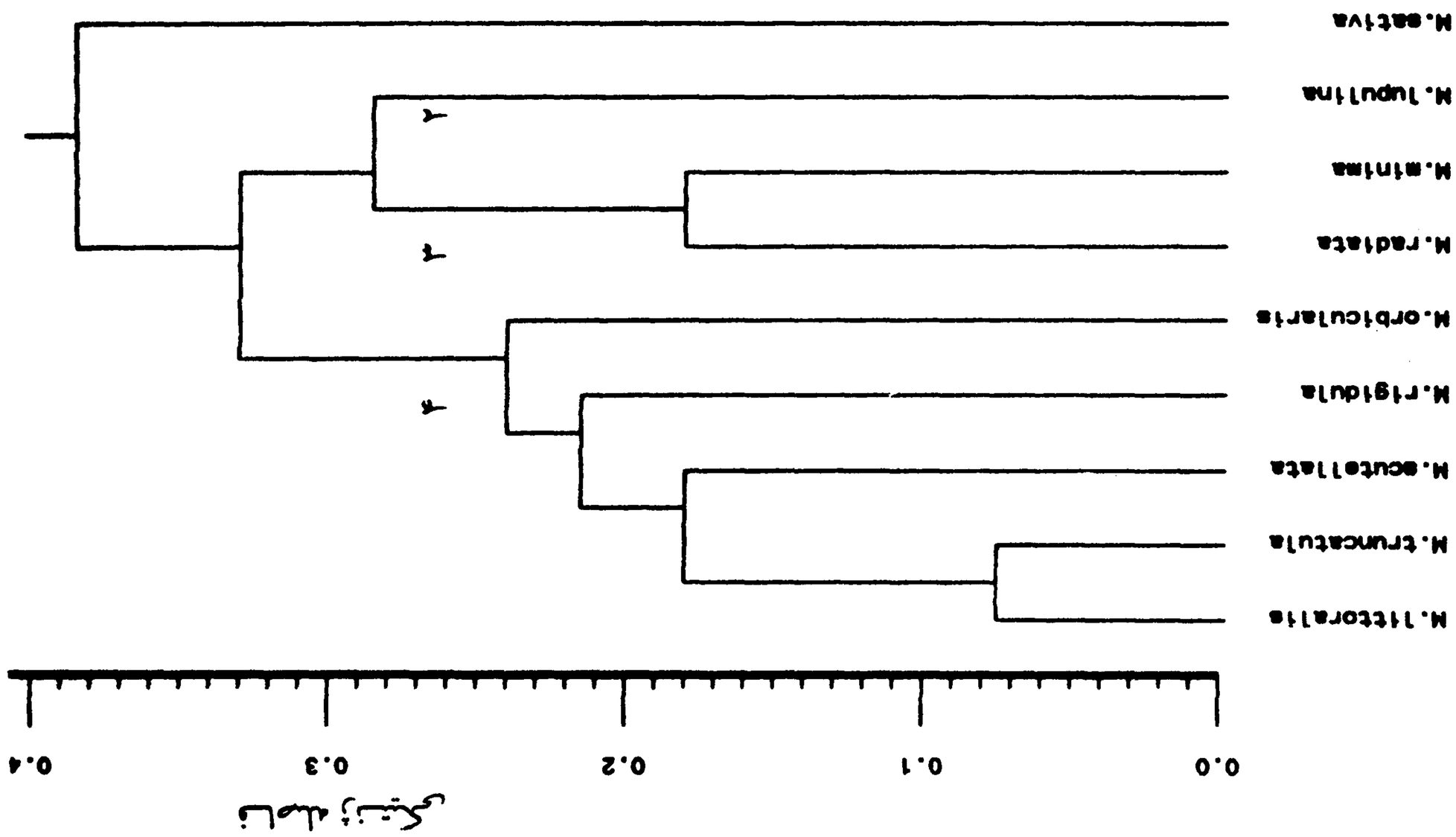
شکل ۱- نمونه‌هائی از طرحهای الکتروفورزی SDS-PAGE پروتئین‌های محلول در نمک برگ (SSP) و محلول در الکل بذر (ASP) در ۹ گونه یونجه (Medicago) با استفاده از روش SDS-PAGE.

مختلف در جدول ۱ وارد شده است. به عنوان مثال نوار یا پروتئین با RF=۰/۲۸ (با وزن ملکولی ٦٧ کیلو دالتون = KD) که پررنگ‌ترین پروتئین محلول در نمک برگ و کلروپلاست بود یکبار در آمارگیری منظور شد. در واقع بر اساس آزمایش‌های متعدد، بافت‌های بدون کلروفیل مانند (ریشه یا کال، داده‌های چاپ نشده) فاقد این پروتئین بودند و می‌توان آن را پروتئین کلروپلاست دانست. نتیجه قابل توجه در اینجا این است که محققین می‌توانند با استفاده از برخی از این مارکرها گونهٔ مورد مطالعه یا هیبرید احتمالی بین آنها را تشخیص دهند. دو سری مارکر پروتئینی از اهمیت بیشتری برخوردار بودند.

۱) پروتئین برگ دارای RF=۰/۸۷ (وزن ملکولی کم و تقریبی ۲۰ KD) در کلیه نمونه‌های یونجه زراعی یا یونجه دائمی گل ارغوانی وجود داشت، در حالی که این پروتئین در یونجه‌های یکساله و گل زرد وجود نداشت. نوار نزدیک آن RF=۰/۸۹ در همه گونه‌ها دیده می‌شد. پس، بمنظور پیدا کردن یک مفهوم بیولوژیکی در مورد این وضعیت لازم است گونه‌های دیگری از یونجه که تیپ‌های متفاوت از نظر یکساله بودن و چند ساله بودن و رنگ متفاوت گل داشته باشند مورد بررسی قرار گیرند.

۲) پروتئین‌های بذر واجد RF برابر با ۰/۱۸ تا ۰/۲۵ نوارهای کاملاً واضح با چند شکلی بالا دارند و می‌توان از روی آنها بسادگی گونه‌های یونجه را از هم تمیز داد.

ماتریس فاصله ژنتیکی برای پروتئینها در جدول ۳ نشان داده شده است. میانگین فاصله ژنتیکی حاصل از مارکرهای پروتئینی با مقدار ۰/۲۹٦ مطابقت خوبی با فاصله ژنتیکی حاصل از مارکرهای RFLP در همین گونه‌های یونجه دارد (۲٦) و نشان می‌دهد که براساس پروتئین‌ها فاصله ژنتیکی گونه‌های یونجه کمتر از شباهت ژنتیکی است (بطور متوسط ۰/۷۰۴ = ۰/۲۹٦ - ۱). در واقع، فاصله گونه‌ها در روش مورد استفاده ضرایب فواصل ژنتیکی (ضریب جفت و جور شدن ساده) از صفر تا یک و برعکس ضرایب شباهت ژنتیکی از یک تا صفر تغییر می‌کند. بگفته دیگر شباهت متوسط ژنتیکی (۰/۷۰۴) بزرگتر از فاصله متوسط ژنتیکی (۰/۲۹٦) است. خوشه‌بندی گونه‌ها براساس این فاصله‌ها در شکل ۲ آمده است. قطع دندروگرام در فاصله ژنتیکی نزدیک به میانگین، ۹ گونه را به ۴ گروه تقسیم می‌کند. گروه ۱: M.sativa که متعلق به بخش مدیکاگو و زیرجنس فالکاگو است و بیشترین فاصله ژنتیکی را از گونه‌های مورد بررسی دارد. گروه ۲: شامل فقط M.lupulina است. این یونجه بیشترین پراکندگی را در چمنزارها و کنار نهرهای مناطق آذربایجانشرقی و غربی دارد. گروه ۳: شامل دو گونه M.radiata و M.minima است که به دو بخش و دو زیر گونه



شکل ۲ - دندروگرام حاصل از ۶۸ نوار پروتئینی در ۹ گونه یونجه

جدول ۳ - فاصله ژنتیکی در ۹ گونه یونجه برای ۶۸ مارکر پروتئینی (۱۰۰۰ × فاصله)

	1up	scu.	tru.	1it.	rig.	min.	rad.	orb.
M.sativa	۳۵۸	۴۱۸	۴۰۳	۳۷۳	۴۰۳	۴۰۳	۳۵۸	۳۴۳
M.orbicularis	۲۸۴	۱۹۴	۲۳۹	۲۳۹	۲۲۴	۲۳۹	۲۲۴	-
M.radiata	۲۶۹	۲۹۹	۴۰۳	۴۰۳	۳۲۸	۱۹۴	-	
M.minima	۳۱۳	۲۸۴	۴۱۸	۳۸۸	۲۵۴			
M.rigidula	۳۲۸	۱۷۹	۲۲۴	۲۲۴	-			
M.littoralis	۳۷۳	۱۹۴	۶۰	-				
M.truncatula	۳۴۳	۱۶۴	-					
M.scutellata	۲۹۹	-						
M.lupulina	-							

$\bar{X}$= ۰/۲۹۶

متفاوت تعلق دارند. گروه ۴: شامل پنج گونهٔ M.orbicularis ، M.rigidula ، M.scutellata ، M.littoralis , M.truncatula است که دو گونه اخیر کمترین فاصله ژنتیکی را در بین ۹ گونه مورد مطالعه نشان می‌دهند.

مقایسه چهار بخش موجود در جدول ۱ و چهار گروه در دندروگرام حاصل از این تحقیق دو ناهماهنگی نشان می‌دهد: گونه M.orbicularis در گروه ۴ و M.minima در گروه ۳ قرار گرفته‌اند در حالی که محل آنها می‌بایست برعکس باشد. چنین ناهماهنگی‌هائی در خوشه‌بندی حاصل از صفات متداول کمی و مورفولوژیک نیز گزارش شده است (۲۲). بدیهی است تعدادی از این ناهماهنگی‌ها با مطالعه همزمان صفات کمی و مارکرهای پروتئینی کیفی و تجزیه‌های کاملتر (از جمله کمی کردن نوارها و استفاده از تفاوتهای موجود) قابل رفع خواهند بود: از این تفاوتها و نشانگرهای پروتئینی حداقل می‌توان در تشخیص گونه‌ها و دو رگ‌های احتمالی آنها استفاده کرد.

در سالهای اخیر استفاده از ایزوزیم‌ها، RFLPها و چند شکلی DNAی تکثیر یافته به طور تصادفی RAPD در مطالعه قرابت و فاصله ژنتیکی جمعیت‌ها، گونه‌ها و جنس‌ها در گیاهان مرسوم شده است (۷ ، ۱۲ ، ۲۶) لکن استفاده از مارکرهای پروتئین در گیاهان کاربرد کمتری داشته است. این بررسی بدنبال بررسی‌های دیگر (۳، ۵، ۱۹، ۲۱ و ۲۵) کارآیی و مفید بودن آن را به اثبات می‌رساند.

REFERENCES

1- Agrwal K.& P.K.Gupta.1983. Cytological studies in Genus Medicago Linn.Cytologia. 48:781-793

2- Barabetti, M.J.1987. Effect of temperture and humidity on disease caused by phoma medicicaginis, resistance in some Medicago cultivars and the incidence of seed-borne inoculum. Aust.J.Exp. Agric.27:851-856 .

3- Cooke, R.J.1989. The use of electrophoresis for distinctness testing of varieties of autogamus species.plant varieties and seeds 2:3-13.

4- Damerval C.1983. Comparaison de six especes de luzernes annulles a,l,aide de characters biometriques et enzymatiques. Agronomie.3(10): 971-982.

5- Garidiner S.E. & M.B.Ford.1988. Identification of cultivars and species of pasture legumes by SDS-polyacrylamide gel electerophoresis of seed protein. plant varieties and seeds, 2:15-26

6- Hames B.D. & D.Richwood. 1990.Gel electrophoresis of proteins,a practical approach (2ed.). Oxford university press.U.S.A.

7- Kiss G.B. , Csanadi, K.Kalman, P.Kalo & L.Okresz.1993. Constraction of a basic genetic map for alfalfa using RFLP,RAPD, isozyme and morphologyical markers.Mol. Gen. Genet.238:129-137.

8- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of stractural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227:680-684.

9- Lesins K.A. & I.Lesins.1979. Genus Medicago(Legominosae). Dr.W.Junk bv.publishers. London .U.K.

10- Lyzink K.A. & C.Y.Tsal.1989. Protein synthesis in endosperm cell cultures of maize. Plant Sciences. 63:105-114.

1 - random amplification of polymorphic DNA

11- Miller M.K. , M.H.Schonohorst & R.G.McDaniel. 1972. Identificaition of hybrids from alfala crosses by electrophoresis of single seed proteins.Crop Science. Vol.12:535-537.

12- Miller J.C. & S.D. Tanksley. 1990. RFLP analysis of phylogenetic relationsnips and genetic variation in the genus Lycopersicon. Theor. Appl. Genet. 80:437-448.

13- Palmer J.D. 1986. Isolation and structural analysis of chloroplast DNA. Methods Enzymol. 118:167-186.

14- Puckridge D.W. & R.J. French. 1983. The annual legume Pasture in cereal ley- farming systems of southern Australia: a review. Agric. Ecosystems Environ. 9:229-236.

15- Quiros F.Q. 1983. Alfalfa, luzerne(Medicago sativa) , in:Tanksley S.D. and T.G. Orton (ed). 1983. Izozymes in plant genetics and breeding, B. P:225.Elsevier.

16- Ridland P.M. & G.N. Berg. 1981. Seedling resistance to pea aphid of lucerne, annual medic and clover species in Victoria. Aus. J. Exp.Agric. Anim. Husb. 21:506-511.

17- Romesburg H.C. 1990. Cluster analysis for researchers. Robert E. Krieger publisging co. Florida, U.S.A.

18- Rose R.J., L.B. Johonson & R.J. Kemble. 1986. Restriction endonuclease studies on chloroplast and mithochondrial DNAs of alfalfa protoclones. Plant Mol.Biol. 6:331-338.

19- Salmanowicz B.P. and D.Krygier. 1992. Comparative study of seed albumins in the genus Vicia. Genetica Polonica 33:27-34.

20- Simon J.P. & A.Simon. 1965. Relationships in annual species of Medicago:Number and morphology of chromosomes. Aus. J.Agric. Res. 16:37-50.

21- Singh A.K., S.Gurtu & R. Tambunathan. 1994. Phylogenetic relationships in the genus Arachis based on seed protein profiles. Euphytica 74:219-225.

22- Small E. 1981. A numerical analysis of major groupings in Medicago employing traditionally used characters. Can. J.Bot. 59:1553-1577.

23- Sneath P.H.A. & P.R. Sokal. 1973. Numerical taxonomy. W.H:Freeman and Co, Sanfrancisco, U.S.A.

24- Switzer R.C.,C.R. Merril & S.Shifrin. 1979. A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. Annal. Biochem. 98:231-237.

25- Vairinhos F.S & D.R. Marray. 1983. The seed proteins of chick pea: comparative studies of Cicer arietinum , C. reticulatum and C. echinospernum. Pl. Syst. Evol. 142:11-220.

26- Valizadeh, M. , K.K. Kang , A. Kanno & T. Kameya. 1996. Analysis of genetic distance among nine Medicago species by using DNA polymorphisms. Breeding Science vol. 46(1) 1:7-10.

The use of protein electrophoresis for estimation of genetic distance among Medicago species.

M.VALIZADEH

Associate Professor, College of Agiculture, University of Tabriz , Iran .

Accepted 26 Feb .1997.

SUMMARY

SDS- PAGE electrophoresis of leaves, seeds and chloroplast salt and alcohol soluble proteins were studied in 9 Medicago species. Certain bands could be easily used by any researcher to identify species under study or their hybrids. A total of 68 alcohol and salt soluble portein bands (16 monomorphic and 52 polymorphic) were used to estimate the genetic distance among the species. These species were clustered together between around 0.1 to 0.4 level of distance, with a mean value of 0.296, showing that the genetic dissimilarity between Medicago species is smaler than their similarity (1-0.296=0.704). Cluster analysis differentiated 9 species in 4 groupes: 1) M.sativa 2) M. lupulina; 3) M. radiata and M.minima and 4) M. orbicularis , M.rigidula , M.scutellata , M.truncatula and M.littoralis. The two latest species were the most similar but the most dissimilar one was alfalfa (M.sativa). Some differences observed, with respect to common classification of Medicego species were discussed.