مطالعه تنوع ژنتیکی و روابط تاکسونومیکی گونه‌های جنس *Lolium* با استفاده از الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره‌ای بذری

سید عباس میرجلیلی[1] و حسین میرزایی‌ندوشن[2]

چکیده

Lolium یکی از جنس‌های مرتعی تیره گندمیان و از قبیله Festuceae است. این جنس در ایران رویش طبیعی دارد و در مراتع شمالی و غربی کشور پراکنده است. این تحقیق به منظور بررسی تنوع ژنتیکی و ارتباط تاکسونومیکی این جنس و شناخت حدود گونه‌های آن در ایران صورت گرفته است. مقدار ۰/۲گرم از بذرهای ۱۸ جمعیت که از نقاط مختلف کشور جمع‌آوری شده یا از بانک ژن مؤسسات تحقیقاتی اخذ شده بود، پس از جدا شدن پوشش‌های آنها، در هاون چینی و با استفاده از ازت مایع ساییده شد و پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر آنها استخراج گردید و با استفاده از ژل پلی اکریل آمید و به روش SDS – PAGE الکتروفورز شد. پس از فرآوری، ۲۱ باند پروتئینی ظاهر شد که هر باند معادل یک صفت تاکسونومیکی منظور گردید. بر مبنای وجود یا عدم وجود باندهای پروتئینی در روی ژلها، جدول داده‌های خام (جمعیت × شماره باند پروتئینی) تهیه گردید و به روش تجزیه به عاملها و تجزیه کلاستر تجزیه و تحلیل شدند. نتایج بدست آمده مطالعات ریخت شناختی صورت گرفته را تأیید نموده و حاکی از جدایی گونه‌های موصوف به لحاظ تاکسونومیکی بود. گونه‌های خودگشن از گونه‌های دگرگشن جدا شدند و تفکیک خوبی بین گونه‌های هر گروه مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: *Lolium*، الکتروفورز، پروتئین‌های ذخیره‌ای بذری، SDS – PAGE ، تجزیه و تحلیل خوشه‌بندی

۱- مرکز آموزش عالی امام خمینی(ره)، وزارت جهاد کشاورزی، تهران.

Email:amirjalili@hotmail.com

۲- مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال

مقدمه

Lolium یکی از جنس‌های مرتعی تیره گندم و از قبیله Festuceae است. این جنس دارای هشت گونه است که پنج گونه آن در ایران رویش طبیعی دارد و در نقاط مختلف کشور یافت می‌شود (میرجلیلی، ۱۳۸۱). گونه‌های مختلف این جنس به لحاظ تولید علوفه اهمیت زیادی دارند. این گونه‌ها ضمن خوشخوراک بودن، علوفه مناسبی نیز به ویژه در فصول نامناسب سال تولید می‌کنند. به‌عنوانمثال، گونه*L. multiflorum* دارای قابلیت رشد در دوره‌های سرد زمستان است و مقاومت زیادی به سرما دارد و علوفه خوبی نیز تولید می‌کند (میرزایی ندوشن و ندرخانی، ۱۳۷۹). شناخت گونه‌های یک جنس اولین گام در اصلاح گیاهان است؛ بنابراین تلاش زیادی برای بررسی تاکسونومیکی این جنس در دنیا صورت پذیرفته است (Bor ، ۱۹۷۰؛ Bor، ۱۹۶۸؛ Clapham و همکاران، ۱۹۷۸؛ Hubbard، ۱۹۵۴؛ Humphries، ۱۹۸۰؛ Mill، ۱۹۸۵؛ Parsa، ۱۹۵۰ و Prat، ۱۹۶۰) ولی بررسی پروتئین‌های ذخیره‌ای بذری به منظور استفاده در مطالعات تاکسونومیکی این جنس کمتر گزارش شده است.

Ferguson و Grabe (۱۹۸۴)، در تحقیقی پروتئین‌های ذخیره‌ای بذری گونه *L. multiflorum* و ۳ جمعیت از *L. hybridum* (*L. perenne* x *multiflorum*) و ۱۴ کولتیوار از *L. perenne* را به وسیله SDS - PAGE تجزیه و تحلیل کردند. Bulinska - Radomska و Lester (۱۹۸۵)، تحقیق نسبتاً کاملی در مورد گونه‌های این جنس داشتند. آنها الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر و تجزیه و تحلیل ریخت‌شناختی ۵۰ صفت درباره ۴۸ جمعیت از ۵ گونه *Lolium* را انجام دادند. در این تجزیه و تحلیل (PCA)، *L. perenne* و *L. multiflorum* و برخی از جمعیت‌های*L. rigidum* (تمام دگرگشن‌ها) را از *L. remotum* و *L. temulentum* (که هر دو خودگشن هستند) مجزا کرد و این دو گونه آخری را نیز از یکدیگر جدا ساخت. الکتروفورز نیز طیف یک شکلی برای *L. temulentum* و *L. remotum* به ترتیب با ۱۳ و ۱۴ باند ایجاد کرد. طیف

L. perenne، *L. multiflorum* و *L. rigidum* به ترتیب ۱۶ و ۱۹ و ۱۸ باند داشت. اما در وجود و شدت باندهای تندرو، اختلافهایی وجود داشت. آنها نتیجه‌گیری کردند که *L. multiflorum* نمی‌تواند از *L. rigidum* تشخیص‌داده شود و پیشنهاد کردند که این دو گونه و نیز *L. perenne* به اندازه کافی متمایز نیستند که بتوان آنها را به‌عنوانگونه‌های مجزا در نظر گرفت (Bulinska–Radomsca و Lester ، ۱۹۸۵). Ferguson و Grabe (۱۹۸۶)، یک روش الکتروفورزی را اجرا کردند تا بین رقمهای *L. perenne*تمایز قائل شوند.

Emoto (۱۹۸۹)، مطالعه‌ای تاکسونومیکی درباره جنس‌های *Lolium* و *Festuca* بر مبنای تنوع ایزوزایمی انجام داد و نتیجه گرفت که *L. perenne* به *L. temulentum* و *L. remotum*شبیه است و پیشنهاد کرد که این دو گونه خودگشن احتمالاً از گونه‌های خواهری[1] یک دگرگشن *L. perenne* منشأ گرفته‌اند. برحسب این مطالعات دو گونه *L. multiflorum* و *L. rigidum* به دو گونه مجزا تقسیم نمی‌شوند. وی در خاتمه پیشنهاد کرده است که گونه‌های جنس‌های *Lolium* و *Festuca* می‌توانند به‌عنوانیک جنس بازنگری شوند.

Murphy و همکارانش (۱۹۹۰)، تجزیه وتحلیل الگوهای بندینگ پروتئین‌های ذخیره‌ای بذری را برای تشخیص ارقام زودرس از ارقام حدواسط و دیررس استفاده کردند. Charmet و Balfourier (۱۹۹۴)، تحقیق وسیعی را درباره روابط تاکسونومیکی بین نمونه‌هایی از *Lolium* و *Festuca pratensis* به وسیله الکتروفورز ژل نشاسته از ۱۱ سیستم آنزیمی انجام دادند. آنها در این تحقیق که در مورد ۳۲ جمعیت از هشت گونه جنس *Lolium* صورت گرفت، به جستجوی روابط بین گونه‌ای و تنوع آنزیمی درون جنس *Lolium* پرداختند.

1- Sister Species

Chen - Lixue و همکاران (۱۹۹۶)، پروتئین‌های بذری ۱۴۷ گونه از تیره Poaceae را با تأکید بر پروتئین‌های لگومین‌مانند و پرولامین‌ها مورد بررسی قرار دادند.

در یک تحقیق، Balfourier و همکارانش(۱۹۹۸)، ساختار ژنتیکی ۱۲۰ جمعیت طبیعی از *L. perenne* و ۵۰ جمعیت خودرو از گونه *L. rigidum* را با استفاده از ژل الکترفورز نشاسته مورد بررسی قرار دادند.

Bennett و Hayward (۱۹۹۹)، با جمع‌آوری ۶۰ جمعیت خودرو از گونه *L. rigidum* از نقاط مختلف مدیترانه اروپایی وآسیای غربی و انتخاب پنج لوکوسی که چهار سیستم آنزیمی را کنترل می‌کردند، به بررسی اختلافهای آنها پرداختند. آنها در تجزیه و تحلیل خود از ژل الکتروفورز نشاسته استفاده کردند.

تنوع در جایگاههای ایزوزایمی یک روش متداول مورد استفاده در ارزیابی تنوع گونه‌ای است (Bennet و Hayward، ۱۹۹۹؛ Charmet و Balfourier، ۱۹۹۴و Loos، ۱۹۹۳a). بنابراین یک اندازه‌گیری واقعی از تنوع ژنتیکی بین و درون جمعیت‌ها ارائه می‌دهند.

مواد و روشها

جدا سازی پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر ۱۸ جمعیت از گیاه مرتعی *Lolium* (با توجه به نظر Bor، ۱۹۷۰، در فلورا ایرانیکا) با استفاده از ژل پلی‌اکریل‌آمید و به روش SDS – PAGE صورت گرفت. مقدار ۰/۲گرم از بذر هر جمعیت پس از جدا شدن پوشش‌های آنها، در هاون چینی و با استفاده از ازت مایع ساییده شده و در زمان سایش به‌تدریج بافر استخراج تا حجم ۲/۵ میلی‌لیتر به پودر حاصل از سایش اضافه گردید. مخلوط حاصل به لوله‌های اپندورف منتقل گردیده، تا ۳ بار و در هر بار به مدت ۵ دقیقه با

۸۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس محلول‌های رویی حاوی پروتئین از رسوب زیرین جدا و تا زمان مصرف در فریزر نگهداری گردیدند.

صفحات شیشه‌ای مربوط به دستگاه الکتروفورز پس از شستشوی کافی با فاصله‌گذاری‌ها روی پایه مربوطه نصب گردیدند. فاصله‌گذاری‌ها به وسیله روغن سیلیکون به طور کامل آغشته شدند تا فواصل بین فاصله گذاری‌ها و شیشه ها گرفته شده و مانع از خروج محلول‌های ژل گردند. جهت ساختن ژل زیرین، ۱۵ میلی‌لیتر از محلول ژل زیرین یا جدا کننده را با ۱۵ میلی‌لیتر از بافر ژل زیرین مخلوط کرده و ۳۰ میلی‌لیتر آمونیوم پر سولفات تازه تهیه شده به آن اضافه گردید. در ادامه ۲۰ میکرولیتر تمد (محلول منعقد کننده) به مخلوط فوق اضافه شد و بلافاصله ترکیب حاصل بین دو شیشه دستگاه ریخته شد تا به ژل تبدیل شود.

پس از انعقاد ژل زیرین، برای ساخت ژل بالایی، ۶ میلی‌لیتر محلول ژل بالایی را با ۶ میلی‌لیتر بافر ژل بالایی مخلوط کرده و ۱۲ میلی‌لیتر آمونیوم پرسولفات و ۱۵ میکرولیتر تمد به آن اضافه گردید. بلافاصله پس از اضافه شدن تمد، این محلول نیز بر روی ژل قبلی ریخته شد[1]. جهت ایجاد چاهک‌های بارگیری پروتئین، شانه مخصوص نیز در محل خود در فضای بین دو شیشه گذاشته شد تا پس از بستن ژل بالایی چاهک‌ها ایجاد گردند.

به منظور بارگیری عصاره پروتئین در دستگاه، ابتدا مقدار ۴۰ میکرولیتر از عصاره پروتئینی به دست آمده از هریک از نمونه‌ها را با ۳۰ میکرولیتر از بافر نمونه مخلوط کرده و به مدت ۲ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شدند. سپس نمونه‌ها در دمای محیط قرار داده شدند تا سرد شوند.

۱- جهت ترکیب اجزاء ژل به مرجع شماره ۱ مراجعه شود

مقدار ۴۰ میکرولیتر از عصاره پروتئینی آماده شده هر نمونه، در درون یکی از چاهک‌ها تزریق گردید. پس از بار کردن تمامی چاهک‌ها، جریان آب خنک کننده دستگاه وصل شد. پس از تنظیم ولتاژ ۱۰۰ ولت و شدت جریان ۴۷ آمپر از دستگاه تأمین جریان الکتریسته[1]، جریان برقرار گردید.

بعد از رسیدن سطح ابتدایی رنگ نمونه‌ها به انتهای ژل، جریان برق دستگاه قطع گردیده و جهت رنگ‌آمیزی باندها، ژل از بین دو شیشه خارج گردید. سپس به مدت ۳۰ دقیقه ژلها در یک تشتک حاوی TCA (تثبیت کننده باندها) روی همزنی با دور متوسط قرار گرفتند. در ادامه نیز به مدت ۳۰ دقیقه با آب مقطر شستشو داده شدند و به مدت یک شب در فضای آزمایشگاه در محلول رنگ کماسی‌بلو قرار گرفتند. از آنجا که محلول رنگ تمام ژل را رنگ می‌نماید، باید فضاهای بین باندها رنگ‌بری شوند تا باندها با وضوح کامل رؤیت گردند. به همین منظور، ژل رنگ شده در محلول رنگ‌بر قرار داده شد تا فضاهای بین باندها به طور کامل بی‌رنگ شوند. بعد از رنگ‌بری نیز ژلها با آب مقطر به طور کامل شسته شدند. در ادامه از ژلها عکسبرداری شده و باندهای حاصل مورد مطالعه و شمارش قرار گرفتند.

۱۸ جمعیت مورد استفاده در این تحقیق به شرح جدول شماره ۱ بودند که در دو ژل ۹ تایی تقسیم شدند.

1- Power Supply

جدول شماره۱- جمعیت‌های مورد استفاده در بررسی پروتئین‌های ذخیره‌ای بذری

ردیف	شماره بذر	نام گونه	نوع بذر	منشا	علامت اختصاری*
ژل A					
G1	۱۸	*L. persicum*	جمع‌آوری	۲۰ کیلومتری رستم آباد	Lps18
G2	۲۰	*L. loliaceum*	جمع‌آوری	رشت	Llo20
G3	۲۲	*L. persicum*	جمع‌آوری	آستانه	Lps22
G4	۲۳	*L. loliaceum*	جمع‌آوری	۴۵ کیلومتری رشت	Llo23
G5	۲۵	*L. perenne*	بانک ژن	دانشگاه تبریز	LPr25
G6	۳۵	*L. loliaceum*	جمع‌آوری	تنگ ارم – برازجان	LRG35
G7	۱۲	*L. rigidum*	بانک ژن	مؤسسه جنگل ومرتع	LR2
G8	۶	*L. rigidum*	بانک ژن	مؤسسه جنگل ومرتع	LR4
G9	۳	*L. rigidum*	بانک ژن	مؤسسه جنگل ومرتع	LR1
ژل B					
G10	۱۴	*L. rigidum*	بانک ژن	مؤسسه جنگل ومرتع	LR3
G11	۲۰۶۸۹/۱	*L. temulentum*	بانک ژن	مؤسسه بررسی آفات	Lte1
G12	۲۸	*L. perenne*	بانک ژن	مؤسسه جنگل ومرتع	LP1
G13	۲	*L. perenne*	بانک ژن	مؤسسه جنگل ومرتع	LP2
G14	۲۹	*L. rigidum*	بانک ژن	مؤسسه جنگل و مرتع	LI1
G15	۱۳	*L. multiflorum*	بانک ژن	مؤسسه جنگل ومرتع	LI2
G16	۴	*L. multiflorum*	بانک ژن	مؤسسه جنگل ومرتع	LI3
G17	۲۹	*L. multiflorum*	بانک ژن	مؤسسه جنگل ومرتع	LM1
G18	۷	*L. multiflorum*	بانک ژن	مؤسسه جنگل ومرتع	LM2

*علامت اختصاری نوشته شده بر مبنای علامتهای ثبت شده در بانک ژن مربوطه بوده است و بنابراین ممکن است با توجه به شناسایی بعدی نام گونه آن تغییر کرده باشد.

بر مبنای وجود یا عدم وجود باندهای پروتئینی در روی ژلها، جدول داده‌های خام تهیه گردید و با استفاده از نرم افزار STATISTICA ویرایش ۹۹ (۱۹۹۵)، داده‌ها تجزیه و تحلیل شدند. با شمارش باندهای پروتئینی ۲۱ صفت در مقابل ۱۸ جمعیت مورد مطالعه مشخص گردید. داده‌های خام جدول شماره ۲ (جمعیت × شماره باند پروتئینی) را تشکیل دادند.

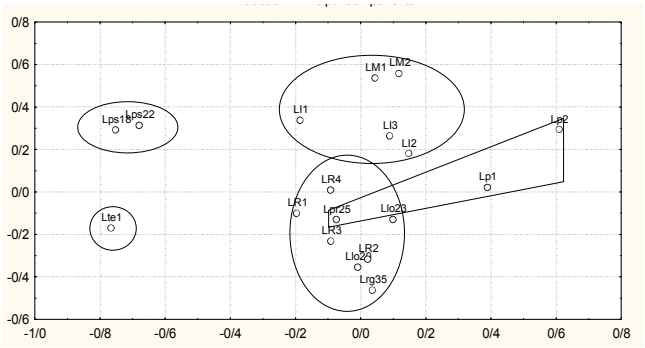
جدول شماره ۲- نتایج استخراج شده از شمارش باندهای پروتئینی مشاهده شده بر روی ژلهای الکتروفورزی در ۱۸ جمعیت مورد مطالعه از گونه‌های جنس *Lolium* در ایران×

جمعیت	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵	۱۶	۱۷	۱۸
شماره باند					ژل A									ژل B				
۱	۰	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۱	۱	۱	۱	۱
۲	۱	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۱	۰	۰	۱	۰	۰	۱	۰
۳	۰	۱	۰	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۴	۱	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۵	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۰	۰	۱	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۶	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۷	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۱	۱	۱	۱	۱
۸	۰	۰	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۰	۱	۱	۱	۱	۱
۹	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۱۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۰	۰	۱	۱	۱
۱۱	۰	۰	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۱۲	۰	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۱۳	۰	۱	۰	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۰	۱	۱	۱	۱	۰
۱۴	۱	۰	۱	۰	۱	۰	۰	۱	۱	۰	۱	۰	۰	۱	۰	۱	۱	۱
۱۵	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
۱۶	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۱۷	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۰	۱	۱	۱	۱	۱
۱۸	۱	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۱	۱	۰	۱	۰	۰	۱	۰	۰	۱	۱
۱۹	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۲۰	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۰	۱	۱	۰	۱	۱
۲۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰

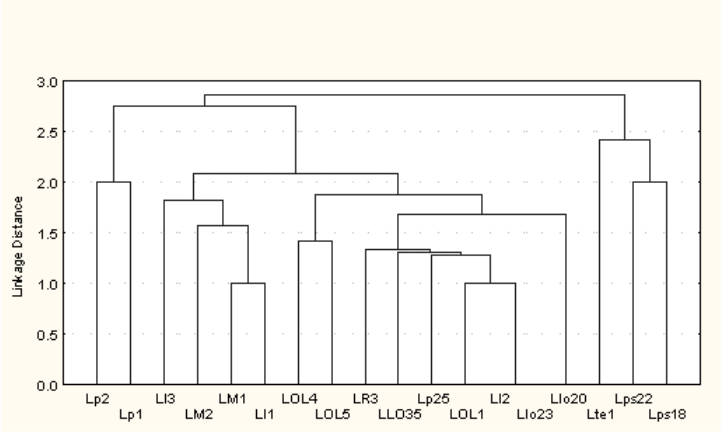
* عدد ۱ به معنای حضور باند و عدد صفر به معنای عدم وجود باند است

نتایج و بحث

تجزیه و تحلیل عاملها و تجزیه و تحلیل خوشه‌ای داده‌های بدست آمده از ژلها (شکلهای شماره ۱ و۲)، نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین جمعیت‌های مختلف این جنس وجود دارد. به این معنی‌که جمعیت‌های یک گونه، در کنار یکدیگر قرار می‌گیرند و از سایر جمعیت‌ها و گونه‌ها متمایز می‌شوند.



شکل شماره ۱- نمودار پراکندگی جمعیت‌های مختلف مورد بررسی در مطالعه پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر با استفاده از دو مؤلفه ۱و ۲ در تجزیه عاملها



شکل شماره۲- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای جمعیت‌های مورد مطالعه با استفاده از داده‌های حاصل از الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر

از سه جمعیت گونه پایای این جنس(*L. perenne*)، دو جمعیت در کنار یکدیگر ولی سومی در میان جمعیت‌های گونه یکساله *L. rigidum* قرار گرفتند. دو جمعیت گونه *L. persicum* در کنار هم و به صورت مجزا از بقیه در سمت چپ نمودار پراکندگی وسمت راست دندروگرام تجزیه و تحلیل خوشه‌ای قرار گرفتند. تنها جمعیت گونه *L. temulentum* در تمام تجزیه و تحلیلها به جمعیت‌های گونه *L. persicum* بسیار نزدیک بود. حسب نظر Terrell (۱۹۶۸) و Mill (۱۹۸۵)، گونه *L. rigidum* دارای دو واریته به نامهای *L. rigidum* var. *rigidum* و *L. rigidum* var. *rottbollioides* می‌باشد. این دو واریته دارای اختلافهای جزیی هستند و گاهی آنها را دو گونه مجزا نام برده‌اند. در این بررسی واریته‌های مختلف این گونه به صورت مخلوط دیده می‌شود و تفکیکی میان آنها دیده نمی‌شود.

استفاده از روشهای آماری نظیر تجزیه عاملها و تجزیه خوشه‌ای برای بررسی اختلاف یا تشابه میان جمعیت‌های گونه‌های مختلف جنس *Lolium* به وسیله پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر نه تنها باعث جدایی جمعیت‌ها از یکدیگر شد، بلکه گونه‌های مختلف را در دسته بندیهای مجزا قرار داد.

در نمودار پراکندگی، چنانکه دیده می‌شود، جمعیت گونه *L. temulentum* به صورت یک نقطه مجزا در سمت چپ نمودار قرار گرفته است. در نزدیکی گونه*L. temulentum* دو نقطه کنار یکدیگر قرار گرفته‌اند که جمعیت‌های گونه*L. persicum* هستند. مؤلفین قبلی نیز به شباهت زیاد این دو گونه اشاره نموده‌اند (Bennett و Heyward، ۱۹۹۹؛ Bennett، ۲۰۰۰؛ Bennett، Hubbard؛۱۹۹۴، ۱۹۵۴ و Humphries، ۱۹۸۰). در دندروگرام همین آزمایش نیز جمعیت‌های این دو گونه در مجاورت یکدیگر قرار گرفته‌اند لیکن میان این دو گروه نیز تفکیکی حاصل شده است.

قرار گرفتن *L. persicum* و *L. temulentum* در یک گروه و جداشدن آنها از بقیه گونه‌ها تأیید دیگری بر جداسازی‌گونه‌های دگرگشن از گونه‌های خودگشن است. شباهت مورفولوژیکی این دو گونه بسیار زیاد است و Loos (۱۹۹۳a) بیان می‌کند که هنگامی که

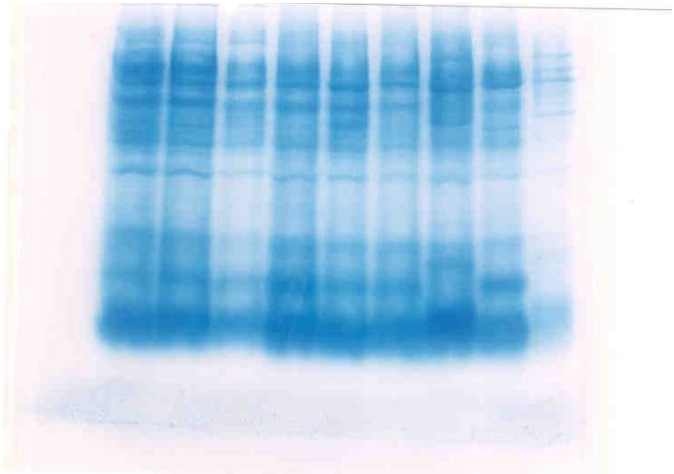
اولین بار *L. persicum* به کانادا وارد شد بـه دلیـل شـباهت زیـاد بـه‌عنـوان*L. temulentum* طبقه‌بندی گردید و دلیل این مدعا را آزمایشهای میزان 2cDNA بـرای ایـن دو گونـه نشـان می‌دهد(2cDNA برای *L. percicum* مساوی ۶/۳۵ و بـرای *L. temulentum*، ۶/۲۳ اسـت) (Loos، ۱۹۹۳b). این دو گونه در تجزیه و تحلیـل فنتیکـی کـه Loos (۱۹۹۳a) انجـام داده است، در یک گروه قرار گرفته و از سایر گونه‌های سرده *Lolium* مجـزا شـده‌انـد. شـباهت مورفولـوژیکی میـان *L. persicum* و *L. temulentum* بـا ایـن واقعیـت کـه هـر دو گونـه به‌عنوانعلف هرز غلات شناخته می‌شوند، توضیح داده می‌شود. بنابراین انتخاب می‌تواند آنهـا را در یک جهت مشابه هدایت کرده باشد (Bennett، ۲۰۰۰).

Bulinska - Radomska و Lester (۱۹۸۵)، در تجزیـه و تحلیـل پـروتئین‌هـای ذخیره‌ای بذر گونـه‌هـای مختلـف همـین جـنس بـه تفکیـک گونـه‌هـای دگرگشـن از خودگشن‌ها رسیدند. در ایـن تحقیـق نیـز تجزیـه عاملهـا و تجزیـه خوشـه‌ای جـدایی گونـه‌هـای دگرگشـن (*L. rigidum*، *L.perenne*، *L.multiflorum*) را از گونـه‌هـای خودگشن (*L. temulentum*، *L. persicum*) نشان داد.

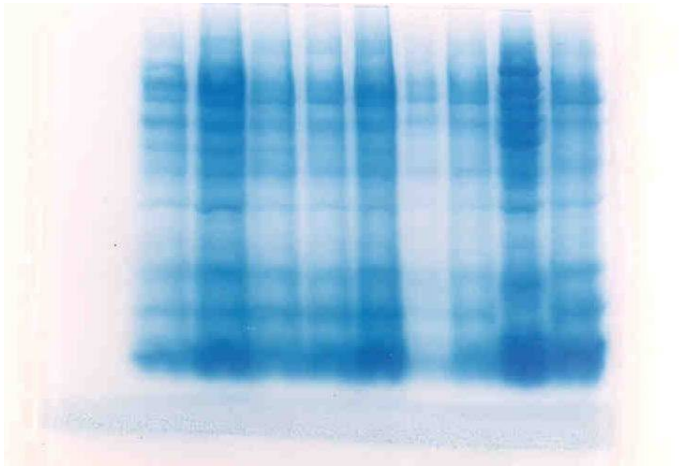
اجتماع گونه‌های دگرگشن در مجاورت یکدیگر در بسیاری از آزمایشـهای صـورت گرفته، به اثبـات رسـیده (Bennett، ۱۹۹۷؛ Loos، ۱۹۹۳b و Terrell، ۱۹۶۸) و گـاهی پیشنهاد یکی کردن این گونه‌ها مطرح شده اسـت، لـیکن هنـوز مـورد بحـث اسـت. در نمودار پراکندگی جمعیت‌ها و دنـدروگرام تجزیـه و تحلیـل خوشـه‌ای، جمعیـت‌هـای گونه*L. multiflorum* در مجاورت جمعیت‌های گونه *L. rigidum* قرار گرفتند. شـباهت این دو گونه و قرابت آنها با جمعیت‌های گونه پایای این جـنس (*L. perenne*) نیـز در هردو نمودار هویدا است.

جمعیت‌های گونه *L. perenne* به صورت یک خوشه مجـزا در کنـار جمعیـت‌هـای *L. multiflorum* قرار گرفته است. این حالت در تجزیه و تحلیل مؤلفین قبلی نیز گزارش شـده است (Balfourier و همکاران، ۱۹۹۸؛ Bennett، ۱۹۹۷؛ Bulinska- Radomska و Lester،

۱۹۸۵؛ Loos، ۱۹۹۳a و ۱۹۹۳b؛ Terrell، ۱۹۶۸). در مجموع می‌توان گفت که ایـن تحقیـق در راستای تحقیقات پیشین و در تأیید جدایی گونه‌های مختلف این جنس است.



شکل شماره۳- ژلِ A حاصل از الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر جمعیت‌های مختلف گونه‌های جنس *Lolium*



شکل شماره ۴- ژلِ B حاصل از الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر جمعیت‌های مختلف گونه‌های جنس *Lolium*

منابع

میرجلیلی س.ع.، ۱۳۸۱، بررسی تاکسونومیکی و سیتوتاکسونومیکی جنس *Lolium* در ایران، رساله دوره دکتری علوم گیاهی گرایش سیستماتیک گیاهی. دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان.

میرزایی ندوشن، ح. و ندرخانی، ه.، ۱۳۷۹. مطالعه کاریوتیپی جمعیت‌های تتراپلوییـد لولیوم. تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران:۴.

Balfourier, F., Charmet, G. and Ravel, C. 1998. Genetic differentiation within and between natural populations of perennial and annual ryegrass (*Lolium perenne* and *L. rigidum*). Heredity, 81: 100-110.

Bennett, J. S. 1997. A phenetic analysis and lateral key of the genus *Lolium* (Gramineae), Genetic Resources and Crop Evolution, 44 : 63-72.

Bennett, S. J. and Hayward D. 1999. Electrophoretic differentiation in isolated populations of *Lolium rigidum* Gaud. Molecular Ecology 8: 123 - 131.

Bennett, J. S. 2000. Morphological differentiation in four species of the genus *Lolium*. Genetic Resources and Crop Evolution, 47: 247 - 255.

Bennett, S. J. 1994. An ecogeographical study of the genus *Lolium* in Europe. PhD Thesis. University of Birmingham.

Bor, N. L. 1970. Gramineae, In: Rechinger K. H. (eds.) Flora Iranica, 70: 150-184. Akademische Druck-und verlagsansalalt-Gras, Austria.

Bor, N. L. 1968. Gramineae, in: Tounsend C.C., Guest E. and Al-Rawi A.(eds) Flora of Iraq, 9:208-224. Ministry of Agriculture. Republic of Iraq.

Bulinska – Radomska, Z. and Lester, R. N. 1985. Relationships between five species of *Lolium* (Poaceae). Plant Systematic and Evolution, 148: 169-175.

Charmet, G., Balfourier, F. 1994. Isozyme variation and species relationship in the genus *Lolium* L.(ryegrass,Gramineae). Theoretical and Applied Genetics. 87: 641-649.

Chen - Lixue, Fischer H., Jensen U. and Chen - Lx 1996. Accumulation of seed storage proteinsand the taxonomy of poaceae. Plant Systematics and Evolution 206: 1 - 4, 243 - 257.

Clapham, A. R., Tutin, T. G. and Moor, D. M. 1978. Flora of the British Isles, Cambridge University Press, Cambridge.

Emoto, T. 1989. Taxonomic studies of *Festuca* and *Lolium* based on isozyme variation. Bulletin of the Akita Prefectural - College of Agriculture. 15, 75-109.

Ferguson, J.M. and Grabe D.F. 1984. Separation of annual and perennial species of ryegrass by gel electrophoresis of seed proteins. Journal of Seed Technology. 9: 137-149.

Ferguson, J. M. and Grabe, D. F. 1986. Identification of cultivars of perennial ryegrass by SDS-PAGE of seed proteins. Crop Sciense. 26: 170-176.

Hubbard, C. E. 1954. Grasses, Penguin Books Ltd, Middlesex.

Humphries, C. J. 1980. *Lolium* L.In: T.G. Tutin, V.H. Heyward, N.A. Burgess, D.M. Moore, D.H. Valentins, S.M. Walters and D.A. Webb (Eds), *Flora Europea* Vol. 5, Alismataceae to Orchidaceae (monocotyledons), pp. 163-154. Cambridge University Press. Cambridge.

Loos, B. P. 1993a. Morphological variation in *Lolium* (poaceae) as a measurment of species relationships. Plant Systematics and Evolution, 188: 87-99.

Loos, B. P. 1993b. Allozyme variation within and between populations in *Lolium* (Poaceae). Plant Systematic and Evolution. 188: 101 - 113.

Mill, R. R. 1985. Lolium L. In: P. H. Davis (Ed.), *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, University Press, Edinburgh.

Murphy, P.M., Culleton, N. and Flaherty, T. 1990. Identification of grass seed cultivars by SDS polyacrylamid gel electrophoresis. Irish Journal of Agriculture Research. 29: 2, 117-127.

Parsa, A. 1950. Flore de l'Iran. vol:V. Publication Du Ministere De l' Education. Museum D'Historie Naturele De Tehran.

Prat, H. 1960. The cytology of certain intergeneric hybrids between *Festuca* and *Lolium*. J. Genetics, 28: 113 - 156.

Statsoft, Inc. 1995. Statistica for windows (User Guide), Tulsa, OK, USA.

Terrell, E, E., 1968. A taxonomic revision of the genus *Lolium*. Technical Bulletin of theUnited States Department of Agriculture, 1392.