الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر جهت مطالعه تنوع موجود بین ارقام مختلف یونجه (*Medicago sativa*)

داود درویشی زیدآبادی[۱]، *حسین میرزایی ندوشن*[۲]، *محسن حسام زاده*[۲]، *حسن مداح عارفی*[۲]

۱ - عضو هیأت علمی مرکز تحقیقات منابع طبیعی و امور دام استان کرمان

۲ - اعضای هیأت علمی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع

چکیده

به منظور مطالعه تنوع ژنتیکی موجود بین ارقام و جمعیتهای موجود یونجه، تعداد ۱۲ نمونه به صورت تصادفی از بین نمونه‌های بانک ژن منابع طبیعی انتخاب شده و مطالعات متعددی در مورد آنها انجام شد. از جمله مطالعات انجام شده، انجام الکتروفورز پروتئینهای ذخیره‌ای بذرهای آنها با استفاده از روش SDS-PAGE بود. بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه، تشابه باندهای پروتئینی زیاد بوده و از بیشتر باندهای تشکیل شده تفاوت زیادی بین نمونه‌ها و ارقام مورد مطالعه مشاهده نمی‌شود. با این حال در دو باند از باندهای تشکیل شده تفاوتهای معنی داری بین نمونه‌ها قابل توجه می‌باشد. ارقام و جمعیتهایی که مورد مطالعه الکتروفورزی قرار گرفته بودند توسط تجزیه کلاستر یا خوشه‌ای نیز مورد دسته بندی قرار گرفتند. ارقام و نمونه‌هائی که در ژل الکتروفورز دارای یک باند در یکی از مکانهای باندی بودند در تجزیه خوشه‌ای نیز در یک دسته قرار گرفتند. بطور کلی دسته بندی بر اساس تجزیه کلاستر روند مشابهی با تفاوتهای مشاهده شده در ژل الکتروفورز از خود نشان داد.

واژه‌های کلیدی: یونجه، الکتروفورز، تجزیه کلاستر، تنوع ژنتیکی و پروتئینهای ذخیره‌ای بذر

مقدمه

اکثر مولکولهای بیولوژیک (اسیدهای آمینه، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک) حامل بار الکتریکی بوده و مقدار آن به عواملی نظیر ویژگی مولکول، pH و سایر خصوصیات سوسپانسیون بستگی دارد. مولکول حامل بار الکتریکی هنگامی که در یک میدان الکتریکی قرار گیرد به سوی الکترودهای قطب مخالف حرکت کرده که آن را در اصطلاح اساس الکتروفورتیکی می‌نامند که در جدا سازی مولکول‌های حامل بار الکتریکی مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد.

از جمله مولکولهای بیولوژیک پروتئینها هستند که دارای بار الکتریکی می‌باشند. پروتئینها را می‌توان از قسمتهای مختلف یک گیاه مانند دانه یا ساقه استخراج کرد و بصورت محلول در حلالهای خاص برای عمل الکتروفورز مورد استفاده قرار داد از آنجا که پروتئینهای مختلف توسط آنزیمهای خاص و الگوهای خاص کپی برداری شده از DNA یک گیاه ساخته می‌شوند، با مشاهده تفاوت بین نوع و میزان پروتئینهای خاص در یک رقم خاص می‌توان به تفاوت آن رقم گیاه با ارقام دیگر اطمینان پیدا کرد.

در این راستا تکنیک الکتروفورز می‌تواند در انجام این عمل به ما کمک نماید و نتایج بدست آمده از این روش در تفکیک ارقام مختلف و مشاهده تنوع بین آنها، نسبت به داده‌های حاصل از مشاهدات مورفولوژیکی معتبرتر خواهد بود، زیرا کنترل عوامل محیطی که موجب افزایش میزان خطا در نتایج آزمایش می‌شوند راحت‌تر خواهد بود.

متأسفانه تا به حال از تکنیک الکتروفورز برای بررسی تنوع ژنتیکی در ارقام یونجه استفاده چندانی نشده است، به طوری که در ایران طبق بررسیهای انجام شده موردی از استفاده این تکنیک در شناسائی یا بررسی تنوع در ارقام یونجه یافت نشد و در منابع خارجی نیز در مورد الکتروفورز پروتئینهای یونجه اطلاعات کافی موجود نیست. با این حال نمونه‌هائی از مطالعات الکتروفورزی مشابه که روی یونجه، سایر گیاهان خانواده لگومینوز و یا دیگر گیاهان صورت گرفته اشاره می‌شود.

Przbylsks (۱۹۹۵) چند نمونه از تجزیه‌های پروتئینی را با استفاده از الکتروفورز برای بررسیهای تاکسونومیکی در لگومها گزارش کرد. او جنس *Pisum*، گونه‌های *Lupinus* و گونه‌های *Phaseolus* را مورد مطالعه قرار داد. در *Pisum* سودمندی تجزیه الکتروفورزی انواع پروتئین از قبیل گلوبولینهای بذر، آلبومینهای بذر و سیستمهای آنزیمی به شدت مورد بحث است. او عقیده داشت که تنوع در آلبومینهای بذر اغلب در آنالیزهای مقایسه‌ای در نظر گرفته نمی‌شود و بایستی بطور گسترده‌تری مورد توجه قرار گیرند. در بررسیهای تاکسونومیکی در مورد *Phaseoulus* و *Lupinus* این بحث مورد توجه قرار گرفت.

Bonetti و همکاران (۱۹۹۵) نیز گزارشی را از یک مطالعه مقایسه‌ای روی شناسائی کولتیوارهای لوبیای (*Phaseolus vulgaris*) ایتالیا از طریق آزمایشات مزرعه‌ای و الکتروفورزی ارائه کردند. هفده کولتیوار لوبیا از میان ارقامی که در ایتالیا بیشتر جنبه تجارتی داشتند و مورد کشت و زرع واقع می‌شدند را برای آزمایشات مزرعه‌ای و آزمایشگاهی انتخاب کردند. در آزمایشگاه با استفاده از هر دو روش IEF-PAGE[1] و الکتروفورز حساس[2] پروتئینهای ذخیره بذر، گلوبولین‌ها و پرولامینها مورد آزمون قرار گرفتند. اختلافات مورفولوژیکی که در مزرعه مشاهد می‌شود گاهی اوقات خیلی ناچیز است و این امر باعث عدم تشخیص اختلاف به خصوص در کولتیوارهای یک گروه می‌شود. روشهای الکتروفورزی ممکن است در برابر این تشابهات پاسخگو باشد. ترکیبی از آزمونهای مورفولوژیکی و الکتروفورزی پروتئینهای بذر بطور معمول اختلافات بین کولتیوارها را بدون در برداشتن هزینه‌های زیاد و صرف زمان در طی انجام آزمایشات مزرعه‌ای امکان‌پذیر می‌سازد. با انجام این آزمایشات مشخص شد دو رقم Helda و Marconi که به طور یکسان بکار رفتند، در الکتروفوروگرامهای حاصل از

1- Isoelectric Focusing
2- Cellulose acetate gel Electrophoresis=CE

IEF و CE با هم تفاوت داشتند، و این بدان معنی است که همان مواد ژنتیکی ثبت شده و بکار رفته تحت دو نام صحیح است.

گزارشی در مورد شناسائی یکی از ارقام گراسی به نام فسکیوی بلند[3] توسط ژل SDS - پلی اکریل آمید[4] استفاده از پروتئینهای بذر توسط Krishnan و همکاران (۱۹۹۷) ارائه شده است. البته گیاه فوق از خانواده *Graminae* است، ولی چون روش مورد استفاده در آن تا حدودی مشابه روش استفاده شده در این آزمایش بود به شرح مختصری از آن می‌پردازیم. در مورد این گیاه باید گفت که تعدادی زیادی از ارقام در طول سالهای گذشته توسط بهنژادگران معرفی شده‌اند که شناسائی ظاهری آنها گاهی اوقات مشکل است به همین دلیل استفاده از یک روش الکتروفورز جهت شناسائی آنها می‌تواند مناسب باشد. آنها گلوبولین‌های قابل حل در نمک و پرولامین‌های قابل حل در الکل را از بذر ۹ رقم فسکیوی بلند بدست آورده و توسط الکتروفورز SDS-PAGE مورد تجزیه و تحلیل قرار دادند. نتایج حاصل از تجزیه گلوبولینها تفاوت چندانی با هم نداشتند بنابراین از آنها نمی‌توان برای شناسائی ارقام استفاده کرد. ولی نتایج حاصل از تجزیه پرولامین‌ها به طور مؤثری با هم اختلاف داشتند. نقشه‌های باندی این پروتئینها بر اساس حضور یا عدم حضور باندهای پپتیدی منحصر به فرد در ارقام مختلف با استفاده از یک دستگاه کامپیوتری چگالی سنج[5] رسم شد.

بنابراین تجزیه SDS-PAGE پرولامینهای قابل حل در الکل می‌تواند به عنوان یک روش معتبر برای شناسائی ارقام این گراس مورد استفاده قرار گیرد.

Ferguson و Grabe (۱۹۸۶) نیز از نقشه کل پروتئینهای بذر توسط SDS-PAGE به عنوان یک وسیله برای شناسائی ارقام چچم استفاده کردند.

3- Tall fescue
4- SDS-PAGE
5- Densitometer

مواد و روشها

ارقام مورد نیاز جهت آزمایش در این تحقیق بطور تصادفی از بین توده‌های موجود در بانک ژن مرکز تحقیقات البرز - کرج انتخاب شدند و فرض بر این بود که این ارقام انتخاب شده نماینده خوبی برای کل توده‌های یونجه موجود در بانک ژن باشند. تعداد ۱۲ رقم به طور تصادفی انتخاب شد که فهرست این ارقام در جدول شماره ۱ آمده است. تعدادی از این ارقام از داخل کشور جمع آوری شده‌اند و تعدادی از ارقام نیز متعلق به کشورهای استرالیا، قزاقستان و ترکیه می‌باشند.

الکتروفورز بر روی پروتئینهای موجود در بذر این ارقام به روش SDS-PAGE (الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید - سدیم دو دوسیل سولفات) انجام شد. اساس این بررسی بر این اصل استوار است که طبق نظریه یک ژن یک آنزیم، تفاوتهای ژنتیکی بین ارقام مختلف باید در نوع پروتئینهای موجود در ساختمان قسمتهای مختلف هر رقم مشاهده شود. بنابراین بذر نیز که یکی از ذخایر غنی پروتئین در گیاهان است از این قاعده پیروی می‌کند. بنابراین، با بررسی تفاوت موجود بین پروتئینهای ذخیره شده در بذر می‌توان اختلاف بین ارقام را با دقت بیشتری مورد مطالعه قرار داد.

جدول شماره ۱ : فهرست ارقام مورد استفاده در بررسی الکتروفورزی

ردیف	کد رقم	مبدا رقم	علامت اختصاری رقم
۱	۲۰۳۱۷	همدانی	L
۲	کریساری	ترکیه	G
۳	۲۰۳۱۴	محلی سربندی	I
۴	۲۰۲۴۸	مراغه	A
۵	۲۰۲۲۰	سیستانی	J
۶	۲۰۳۱۹	بمی	C
۷	۲۰۲۸۴	خوانساری	K
۸	۲۰۲۴۷	بناب مرند	D1
۹	۲۰۳۱۸	آذربایجان(ارومیه)	H
۱۰	۲۵۶۶	امریکایی (FAO)	F1
۱۱	۲۰۳۱۳	از توده‌های بمی	E
۱۲	۲۵۹۱	امریکایی	B

* شماره‌های مورد استفاده در نمودارهای مربوط به تجزیه کلاستر

** علامت انحصاری مربوط به هر رقم که در مطالعه الکتروفورزی مورد استفاده قرار گرفته.

با اطلاعات ما بررسی الکتروفورزی ارقام یونجه به شکلی که در این آزمایش انجام شده است تا کنون صورت نگرفته است. به همین دلیل این آزمایش یک کار جدید و مقدماتی بر روی یونجه است و بنابراین احتیاج به بررسی زیادتری جهت تکمیل آن و انجام مطالعات بعدی می‌باشد.

پس از تهیه محلولهای مورد نظر اقدام به تهیه عصاره پروتئینی از بذرهای ارقام مورد نظر برای آزمایش الکتروفورز گردید که شامل بذرهای ۱۲ رقم بود. ابتدا از بذرهای هر

رقم مقدار ۰/۵ گرم جدا شد (بذرها سالم و عاری از هر گونه ناخالصی و بذرهای علفهای هرز بودند). این بذرها در هاون چینی بطور کامل خرد شد و بطور تقریب بصورت پودر در آمد و پس از آن با یک الک ریز (نمره ۱۴۵) الک شدند. سپس ۰/۰۵ گرم از پودر غربال شده در لوله‌های اپندورف[1] با گنجایش ۱/۵cc ریخته و مقدار ۱cc از بافر نمونه به آن اضافه شد و درب لوله محکم بسته شد. در ادامه، محتویات لوله خوب بهم زده شد تا پروتئینها بتوانند در بافر حل شوند. برای این که پروتئینها بهتر حل شوند لوله‌ها به مدت یک دقیقه در آب جوش قرار گرفتند و سپس از آب جوش بیرون آورده و در یک ظرف حاوی قطعات یخ قرار گرفتند. بعد از آن لوله‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در سانتریفوژ با g= ۸۴۹۵ قرار گرفتند و بعد عصاره پروتئینی که به صورت محلول در قسمت بالای لوله جمع شده بود توسط یک پیپت پاستور جدا کرده و در درون یک لوله اپندورف تمیز نگهداری گردید.

در ادامه کار پس از تهیه ژل به روش درویشی (۱۳۷۷)، بیست میکرولیتر از عصاره استخراج شده هر رقم مورد مطالعه در چاهک‌های ژل بار گردید. با شدت جریان ۴۰ آمپر و ولتاژ ۸۰ ولت، عصاره‌های پروتئینی بر روی ژل رانده شدند. در پایان، زمانی که خط رنگی پیشتاز به یک سانتی متری انتهای ژل رسید، ژلها از دستگاه خارج شده و مطابق روش پیشنهادی درویشی (۱۳۷۷) رنگ‌آمیزی و باندهای الکتروفورزی مورد ارزیابی و مطالعه قرار گرفتند.

از روشهای مختلف آماری از جمله روش چند متغیره تجزیه خوشه‌ای جهت دسته‌بندی ارقام و جمعیتهای مورد مطالعه بر مبنای باندهای الکتروفورزی استفاده گردید.

1- Ependorf

نتایج

نتایج حاصل از این آزمایش در شکل شماره ۱ دیده می‌شود، که مربوط به تجزیه پروتئینهای بذری می‌باشد. همانطور که ملاحظه می‌شود، تشابه باندهای پروتئینی در این شکل زیاد است. البته یکی از دلایل این گونه تشابهات این است که در این آزمایش کل پروتئینهای بذر استخراج شده‌اند. بنابراین تعداد باندها خیلی زیاد هستند ولی در عین حال در دو سری از باندهای تشکیل شده در این ژل تفاوتهای بین ارقام قابل مشاهده هستند، یکی در مکان شماره (۲) که البته تفاوت خیلی جزئی است و یکی در مکان شماره ۱ که این سری باند به روشنی در بین ارقام مختلف متفاوت است. ارقام ۲۰۳۱۸، ۲۰۳۱۳، ۲۰۳۱۷ و ۲۵۶۶ دارای یک باند قوی در این محل هستند و ارقام ۲۰۲۴۷، کریساری و ۲۵۹۱ از نظر این باند ضعیف تر هستند و ارقام ۲۰۳۱۹، ۲۰۲۲۰ و ۲۰۳۱۴ باند ضعیفی را دارا می‌باشند و ارقام ۲۰۲۸۴ و ۲۰۲۴۸ دارای باند بسیار ضعیفی می‌باشند. البته در مکان شماره یک نیز ارقام ۲۰۳۱۸، ۲۰۳۱۴، ۲۰۳۱۳ و ۲۰۳۱۷ دارای باند قوی‌تری نسبت به بقیه ارقام می‌باشند.

تجزیه کلاستر ارقام مورد مطالعه

این تجزیه بر روی ماتریس میانگین‌های ۱۴ صفت مورفولوژیک در کنار بررسیهای الکتروفورزی برای ۱۲ رقم یونجه مورد مطالعه انجام شد. روش تجزیه کلاستر مورد استفاده برای این ارقام نیز UPGMA بود که مقدار ضریب کوفنتیک برای این روش مورد استفاده ۰/۸۵ بدست آمد که نشان دهنده مناسب بودن روش UPGMA برای اطلاعات مربوط به این ارقام است. دندروگرام مربوط به این تجزیه کلاستر در نمودار شماره ۱ نشان داده شده است. تعداد کلاستر انتخابی در این تجزیه ۴ کلاستر است که رقم ۲۰۳۱۹ به تنهائی در یک کلاستر، رقم ۲۰۲۸۴ نیز به تنهائی در کلاستر دیگر و بقیه ارقام نیز در کلاستر ۳ و ۴ قرار گرفتند. شرح این ۴ کلاستر

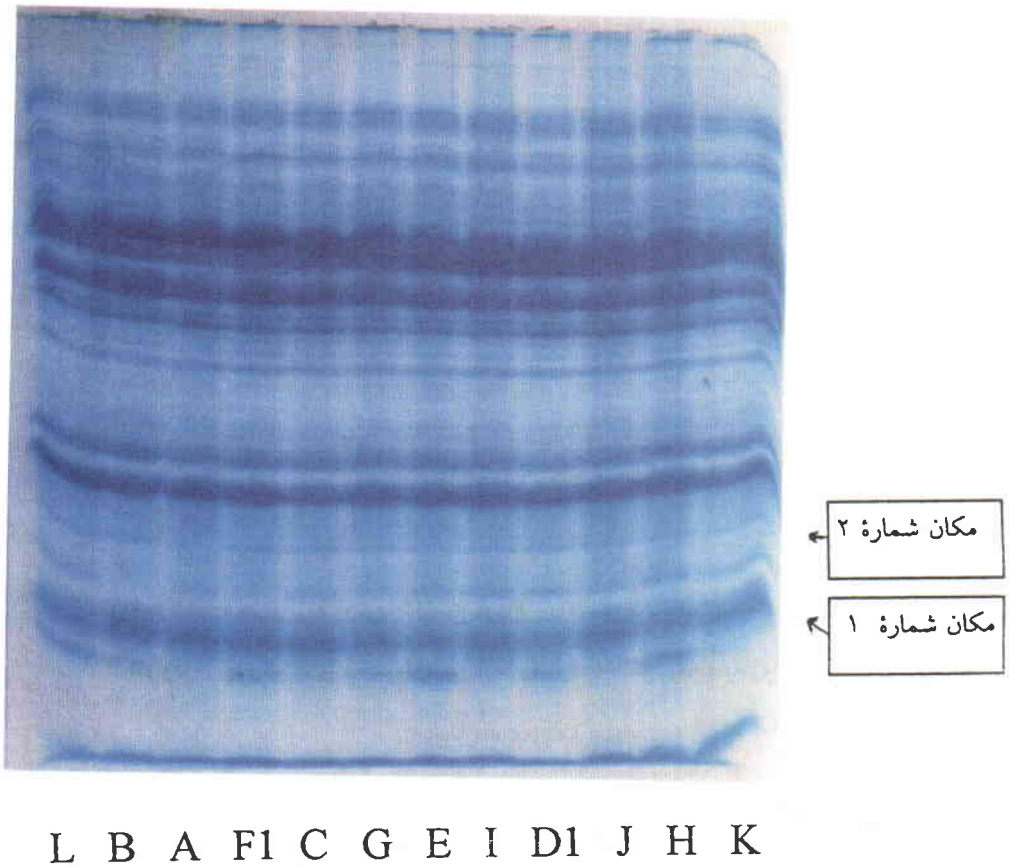
به صورت زیر است:

کلاستر ۱ :۲۰۳۱۹

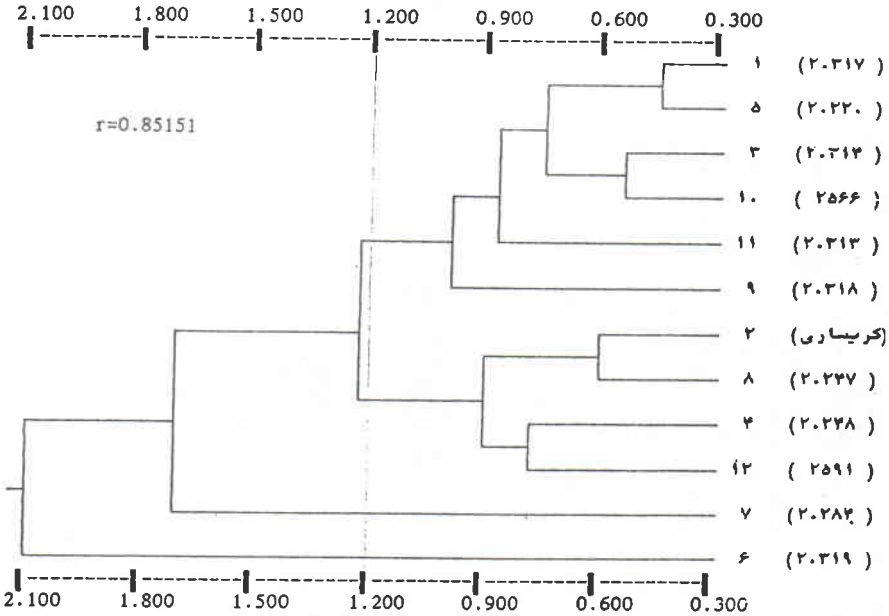
کلاستر ۲ :۲۰۲۸۴

کلاستر ۳ : کریساری، ۲۰۲۴۷، ۲۰۲۴۸، ۲۵۹۱

کلاستر ۴ : ۲۰۳۱۷، ۲۰۲۲۰، ۲۰۳۱۴، ۲۵۶۶، ۲۰۳۱۳، ۲۰۳۱۸



شکل شماره ۱: باندهای پروتئینی حاصل از الکتروفورز پروتئینهای بذر



نمودار (۱) - دندروگرام تجزیه کلاستر ارقام بر اساس مشخصات باندهای حاصل از الکتروفورز پروتئینهای ذخیره‌ای بذر ارقام مورد مطالعه یونجه به روش UPGMA.

(r= Cophenotic Value).

بررسی نتایج تجزیه کلاستر باندهای الکتروفورزی

همانگونه که ملاحظه می‌گردد ارقام ۲۰۳۱۷، ۲۵۶۶، ۲۰۳۱۳ و ۲۰۳۱۸ که در تجزیه الکتروفورزی ارقام دارای یک باند قوی در مکان شماره ۱ هستند و از نظر این باند با بقیه ارقام تفاوت قابل ملاحظه‌ای را نشان می‌دهند در تجزیه کلاستر نیز در مجاور هم و در

یک کلاستر قرار گرفته‌اند.

همچنین ارقام ۲۰۲۴۷، کریساری و ۲۵۹۱ که دارای باند ضعیف‌تری در این مکان هستند، ولی باز از بقیه ارقام قابل تفکیک هستند، در نتایج حاصل از تجزیه کلاستر در یک گروه جداگانه قرار گرفته‌اند. ارقام ۲۰۳۱۹ و ۲۰۲۸۴ نیز که در دو کلاستر جداگانه قرار گرفته‌اند از نظر این باند در مکان مورد نظر بسیار ضعیف هستند که باز از سایر ارقام قابل تفکیک می‌باشند.

باند مذکور در سایر ارقام حد واسط ارقام دیگر بوده ولی بالاخره در یک گروه قرار گرفته‌اند مانند ارقام ۲۰۳۱۴ و ۲۰۲۲۰ که به رغم وجود یک باند ضعیف جزو گروهی قرار گرفته‌اند که قویترین باند را دارا می‌باشد باید گفت که این امر می‌تواند به این دلیل باشد که مطالعه الکتروفورزی بر روی ارقام مورد نظر جامع نیست و باید ارقام و جمعیتهای بیشتری را مورد مطالعه قرار دهد. مطالعات بعدی بر روی این ارقام و سایر ارقام یونجه این نتایج را کاملتر خواهد کرد.

پیشنهادات

- مطالعات الکتروفورزی تا حد زیادی نتایج حاصل از بررسیهای مزرعه‌ای را تأیید می‌کند، بنابراین با در نظر گرفتن هزینه‌های مزرعه‌ای و آزمایشگاهی می‌توان در مطالعات بعدی یکی از آن دو را مورد استفاده قرار داد.

- استفاده از تکنیک الکتروفورز برای بررسی تنوع ژنتیکی در بین ارقام یونجه ادامه و توسعه یابد و استفاده از مجموعه‌های پروتئینی مختلف در بررسیهای الکتروفورزی مورد عنایت بیشتر قرار گیرد. مجموعه‌های پروتئینی مورد نظر شامل پروتئینهای محلول در آب، پروتئینهای محلول در الکل و پروتئینهای محلول در نمک می‌باشند.

- تهیه الگوهای باندی توسط الکتروفورز برای ارقام اصلاح شده جهت شناسایی ارقام مختلف توسط تکنیک الکتروفورز توصیه می‌شود.

منابع

درویشی زید آبادی، داود، ۱۳۷۷. بررسی تنوع ژنتیکی موجود بین توده‌های یونجه (*Medicago sativa* L). پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس.

رضائی، عبدالحمید، ۱۳۷۲. به نژادی یونجه. انتشارات مرکز نشر دانشگاهی. تهران. چاپ اول. ۲۳۳ ص.

علمی آخوندی، اسماعیل. ۱۳۷۰. مقدمه‌ای بر بیوشیمی کاربردی. انتشارات دانشگاه تهران. ۴۱۶ ص.

کریمی، هادی، ۱۳۶۹. یونجه. مرکز نشر دانشگاهی. تهران. ۳۷۱ ص.

مقدم، محمد، ۱۳۷۳. آشنائی با روشهای آماری چند متغیره.انتشارات پیشتار علم. ۲۰۸ص.

Aufrere, J., D. Boulberhane, D. Graviou, J. P. Andrieu and C. Demarquilly, 1994. Characterisation of *in situ* degradation of lucerne proteins according to forage type (green forage, hay and silage) using gel electrophoresis. Animal Seed Science and Technology, 50: 75-85

Bonetti, A., A. Miggiano, G. Dinelli and A. Lovato, 1995. Identification of bean (*Phaseolus vulgaris*) cultivars grown in italy by field and electrophoresis tests. a comparative study. Seed Science and Technology, 23: 69-84

Diwan, N., G. R. Bauchan and M. S. McIntosh, 1994. A Core colection for United States Annual *Medicago* Germplasm Collection. Crop-Sci., 34: 279-284

Donald, H. W., 1990. Electrophoretic and isoelectric focusing techniques in fisheries management. CRC Press. PP. 350

Krishnan, H. B. and D. A. Sleper, 1997. Identification of tall fescue cultivars by sodum dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis of seed proteins.

Przybylska, J., 1995. Some examples of the use of electrophoretic protein analysis in taxonomic investigations of leguminous plants. Journal of Applied Genetics, 36: 255-271

Seed storage electrophoresis for investigating existing variation between alfalfa (*Medicago sativa*) Caltivars.

Darvishi-Zaidabadi*[1], *D., Mirzaie-Nodoushan*[2], *H. Hesamzadeh*[3], *M. and Maddah-Arefi*[4], *H.

Abstract

In order to investigate genetic variation between existing cultivars and populations of alfalfa (*Medicago sativa*), twelve accessions were randomly selected from Natural Resources Gene Bank, and several stadies were carried out on them. Seed storage protein electrophoresis was perfored on the accessions using SDS-PAGE technique.

Based on the results of this stady, the protein bands were firly similar. Howerer, there was a remarkable difference between the accessions based on the two distinct bands.

Cluster analysis was also performed on the cultivars and accessions. The accessions with a distinct different band in electrophoresis gel located in a common group in cluster analysis. Overally, classification based on claster analysis showed a similar trend to the electrophoresis gel.

Key words: Alfalfaa, Electrophoresis, Cluster analysis, Genetic variation.

1- Scientific Board Member of Natural Resources Research Center of Kerman Province

2- Scientific Board Member of Research Institute of Forests and Rangelands

3- PhD Postgraduate student of Tehran University

4- Scientific Board Member of Research Institute of Forests and Rangelands