ارزیابی تنوع ژنتیکی نه جمعیت فستوکا با استفاده از الکتروفورز پروتئینهای ذخیره‌ای بذر

لیلا میرجانی[1]، عباس قمری زارع[2]، حسین میرزایی ندوشن[2] و غلامرضا بخشی خانیکی[3]

چکیده

نه جمعیت از گونه *Festuca arundinacea* در این بررسی مورد مطالعه قرار گرفت. روش SDS-PAGE از الکتروفورز در این بررسی به کار گرفته شد. پس از استخراج پروتئینهای ذخیره‌ای بذر و راندن آنها بر ژل آکریل آمید، تنوع باندهای پروتئینی مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از شناسایی مقرهای مختلف باندهای موجود روی ژل، حضور یا عدم حضور این باندها و نیز تراکم آنها مورد توجه قرار گرفت.

در مجموع ۲۲ موقعیت باند پروتئینی بر روی ژل مشاهده گردید. تعداد باندها در جمعیت خارجی A2210 بیش از سایر جمعیتها بود و جمعیت جمع‌آوری شده از سنندج از این نظر دارای کمترین تعداد بود. نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای، جمعیتها را به دو دسته تقسیم نمود. در این دسته‌بندی جمعیتهای خارجی در یک دسته متمایز قرار گرفتند که حاکی از احتمال وجود منشا مشترک برای آنها بود. بیشترین فاصله میان جمعیت جمع‌آوری شده از گرگان و یک جمعیت خارجی بود.

واژه‌های کلیدی: الکتروفورز، فستوکا، تجزیه خوشه‌ای، پروتئینهای ذخیره‌ای بذر، SDS-PAGE.

۱- تهران، دانشگاه پیام نور، دانشکده علوم.

۲- تهران، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، صندوق پستی ۱۱۶ - ۱۳۱۸۵

۳- تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم.

مقدمه

Festuca arundinacea یک گراس خوشه‌ای مقاوم به سرماست، از این جهت به عنوان یک گراس علوفه‌ای مهم مورد استفاده قرار می‌گیرد. این گونه دارای چندین خصوصیت مطلوب از جمله سازگاری با دامنه وسیعی از شرایط خاک، عملکرد خوب علوفه، فصل طولانی چرا، مقاومت عالی، تولید بذر عالی و حفاظت کننده خاک است (Hannaway و همکاران، ۱۹۹۹).

F. arundinacea پوشش مناسبی را برای میلیونها هکتار از اراضی قابل فرسایش تأمین کرده است (Gordon، ۱۹۷۵). از آن جهت در فرودگاهها، زمینهای بازی، میدان گلف، زمین فوتبال، بین بزرگراهها، کنار جاده‌ها، مجراهای آب و خاکریزها مورد استفاده قرار می‌گیرد (Wasser،۱۹۸۲ و Charles و همکاران، ۱۹۹۱). کولتیوارهایی از آن، که دارای فرم رویشی کوچکتر، برگهای نرمتر و رنگ سبزتر و رشد عمودی کاهش یافته‌ترند، به مقدار قابل توجهی به عنوان چمن مورد استفاده قرار می‌گیرند (Fairely و Hampton، ۱۹۹۸).

در این بررسی مطالعه و ارزیابی تنوع ژنتیکی در تعدادی از جمعیتهای *F. arundinacea* از رویشگاههای مختلف کشور و چند جمعیت خارجی با استفاده از الکتروفورز صورت گرفته است.

الکتروفورز پروتئینها برای جمع‌آوری و ایجاد داده‌های سیستماتیک از ماکرومولکولها روشی است که به صورت وسیع مورد استفاده قرار می‌گیرد و به صورتی فزاینده در بین متخصصان سیستماتیک گیاهی محبوبیت یافته است (کرافورد، ۱۳۷۸).

دلیل اساسی برای استفاده از الگوهای الکتروفورزی پروتئینهای ذخیره‌ای بذر در طبقه‌بندی این است که پروتئینها تولیدات نسبتاً مستقیم ژن می‌باشند. به این ترتیب تصور بر این است که این الگوها باید نمایشگر معیاری از تشابهات و اختلافات وراثتی

در بین گیاهان که با یکدیگر مقایسه می‌شوند، باشند. پروتئینها که به طور منظم در داخل یک ژل و تحت مجموعه‌ای از شرایط مشخص و متمایز از یکدیگر مهاجرت می‌نمایند به نوعی از یکدیگر متفاوتند. این تفاوت ممکن است در بار الکتریکی خالص آنها، اندازه و شکل آنها یا ترکیبی از مجموعه این عوامل باشد. گیاهان مولد پروتئینهای متفاوت هستند که از نظر وراثتی با یکدیگر فرق دارند. در برخی موارد چنین تفسیرهای وراثتی را می‌توان در سطح اختلاف اللی ژنهای ساختاری به عمل آورد. در مواردی دیگر انجام چنین تفسیرهایی غیر ممکن است و تنها می‌توان گفت که برخی اختلافات وراثتی وجود دارد (کرافورد، ۱۳۷۸).

Bulinska-Radomska و Lester (۱۹۸۵) با تکیه بر مورفولوژی و الکتروفورز پروتئینی نشان دادند که *F. arundinacea* هگزاپلوئید و *F. pratensis* دیپلوئید هر دو طبقه خاصی دارند. همولوژی بالای پروتئینی این دو گونه با *F. gigantea* ارتباطات فیلوژنتیکی را بین این تاکسونها نشان می‌دهد.

در این تحقیق نیز با استفاده از روش SDS-PAGE تفاوتهای موجود بین جمعیتهای مورد نظر، مورد ارزیابی و مطالعه قرار گرفتند.

مواد و روشها

جمعیتها و گونه‌های مورد مطالعه

بذر ۹ جمعیت از گونه *F. arundinacea* که در مزرعه‌ای در مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کاشته شده بود فراهم شده و از حیث تنوع ژنتیکی در سطح پروتئینهای ذخیره‌ای بذر مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول شماره ۱).

مطالعات الکتروفورزی

روش SDS-PAGE از الکتروفورز در این تحقیق به کار گرفته شد. دستورالعمل تهیه محلولهای مورد نیاز در اجرای این روش به تفصیل توسط میرزایی ندوشن و همکاران، (۱۳۸۰) ارائه شده است.

تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از الکتروفورز

ابتدا تعداد مقرهای باندهای موجود در ژل شناسایی گردید و حضور یا عدم حضور این باندها در نمونه پروتئینی مشخص گردید. حضور باندهای مشترک میان چندین جمعیت می‌تواند موجب تلقی منشاء ژنتیکی مشترک میان آن جمعیتها گردد. در ادامه حضور هر باند با عدد یک و عدم حضور آن در آن محل با عدد صفر مشخص گردید. به این ترتیب ماتریس عددی بدست آمد که سطرهای آن را جمعیتها و ستونهای آن را متغیرهای حاصل از محلهای مختلف باندهای پروتئینی تشکیل می‌دادند. از این‌رو ماتریس عددی جهت تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA استفاده گردید. از نرم‌افزار JMP در تجزیه خوشه‌ای استفاده شد (میرزایی ندوشن و همکاران، ۱۳۸۰).

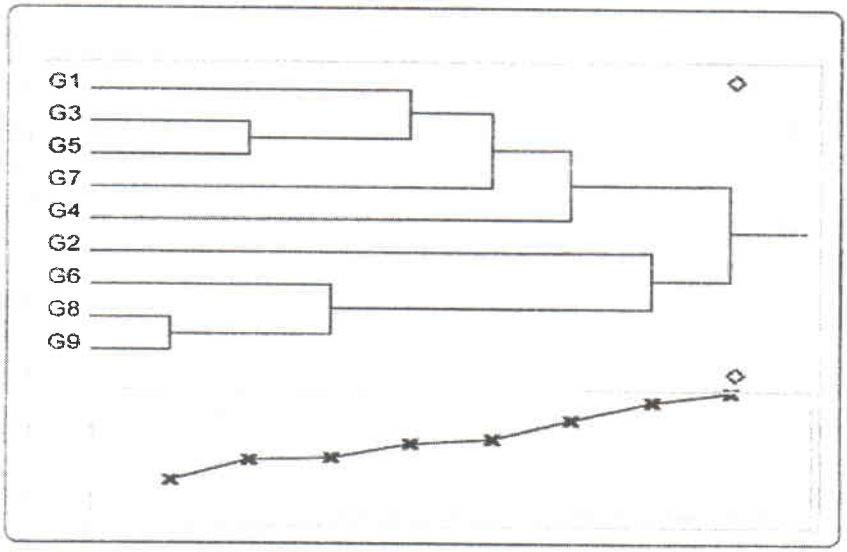
نتایج و بحث

در میان ۹ جمعیت مورد بررسی ۲۲ باند مشاهده شد. نامگذاری باندهای پروتئینی به این صورت بود که باند شماره ۱ در بالای ژل (انتهای کاتدی) و باند شماره ۲۲ در پایین ژل (انتهای آندی) قرار داشت. جمعیت خارجی A2210 دارای بیشترین تعداد باند پروتئینی بود و تعداد باندهای پروتئینی جمعیت سنندج از سایر جمعیتها کمتر بود. صرف نظر از یک هماهنگی عمومی که بین باندهای جمعیتهای مختلف مشاهده می‌شد، باندهای حاصل، دارای تراکم متفاوتی بودند.

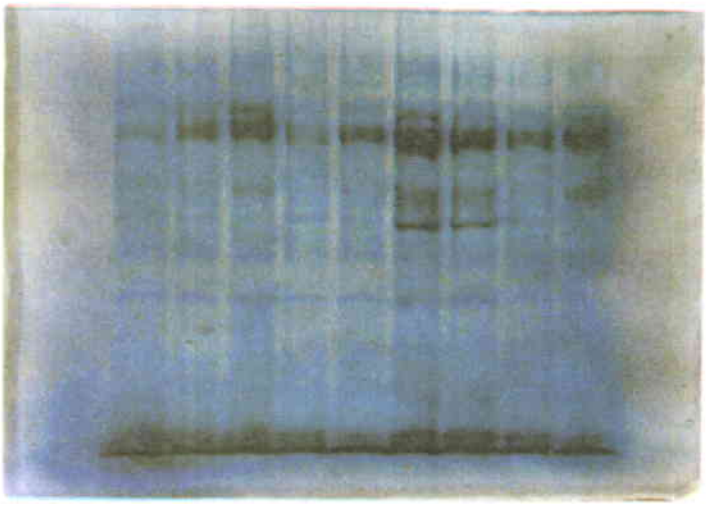
به منظور مشخص کردن میزان تشابه یا فاصله ژنتیکی از نظر پروتئینهای ذخیره‌ای بذر تجزیه خوشه‌ای انجام گرفت. نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای داده‌های الکتروفورزی (شکل شماره ۱) نشان می‌دهد که جمعیتها به دو دسته تقسیم می‌شوند. جمعیتهای خارجی Dovey و سنندج و جمعیت خارجی Barraco و جمعیت خارجی بی‌نام در یک دسته و بقیه جمعیتها در دسته دیگر قرار گرفتند. کمترین فاصله بین جمعیت خارجی Barraco و جمعیت خارجی بی‌نام بود که احتمال وجود منشاء ژنتیکی مشترک را بین آنها نشان می‌دهد. سپس جمعیت سیراچال و فریدن کمترین فاصله را داشتند. بیشترین فاصله بین جمعیت گرگان و جمعیت خارجی بی‌نام بود که نشان‌دهنده تفاوت در ژنهای کدگذار پروتئینهای ذخیره‌ای بذر این دو جمعیت است. و از آنجایی که جمعیتهای خارجی به جز یکی در یک دسته قرار گرفتند اثر نسبی محیط بر جمعیتها را نیز نشان می‌دهد.

جدول شماره ۱- اسامی و شماره ثبت جمعیتهای مورد مطالعه

کد	جمعیت
G_1	*F. arundinacea* نمونه گرگان
G_2	*F. arundinacea* نمونه خارجی Dovey
G_3	*F. arundinacea* نمونه سیراچال
G_4	*F. arundinacea* نمونه خارجی A2210
G_5	*F. arundinacea* نمونه فریدن
G_6	*F. arundinacea* نمونه سنندج
G_7	*F. arundinacea* نمونه سمیرم 77
G_8	*F. arundinacea* نمونه خارجی Barraco
G_9	*F. arundinacea* نمونه خارجی بی‌نام



شکل شماره ۱- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA برای صفات الکتروفورز در کلیه جمعیتهای مورد مطالعه



شکل شماره ۲- باندهای حاصل از الکتروفورز پروتئینهای ذخیره‌ای بذر جمعیتهایی از فستوکا

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از کلیه همکاران بخش ژنتیک و فیزیولوژی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع که ما را در اجرای این پروژه یاری نمودند، به ویژه از سرکار خانم مهندس شریعت که از هیچ گونه همکاری دریغ نکردند تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

۱- کرافورد، د.، ۱۳۷۸. سیستماتیک مولکولی گیاهی. ترجمه: رحیمی نژاد، م.ر.، انتشارات دانشگاه اصفهان.

۲- میرزایی ندوشن، ح.، شریعت، ا.، اسدی کرم، ف.،۱۳۸۰. ارزیابی تنوع ژنتیکی موجود در جمعیتهای مختلف تاغ (*Haloxylon spp.*) با استفاده از الکتروفورز. تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی ایران، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع. جلد ۷،۲۶-۱

3- Buliska- Radomska, Z and Lester, R.N., 1985. Relationships between three species of *Festuca* sect. Bovinae (Poaceae). Plant Systematic. Evole. 153: 175-182.

4- Charles, G. W., Blair, G. J. and Andrews, A. C., 1991. The effect of sowing time, sowing technique and post sowing weed competition on tall fescue (*Festuca arundinacea*) seedling establishment. Australian Journal of Agricultural Research, 42: 1251-1259.

5- Fairely, D. T. and Hampton, J. G., 1998. Forage seed production. Vol. I: Temperate Species. W. C. Young . III. 287-297.

6- Gordon, A. H. 1975. Electrophoresis of Proteins in Polyacrylamide and Starch Gels. New York, Elsevier.

7- Hannaway, D., Fransen, S. and Copper, J., 1999. Tall Fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). reported from Oregon State University, pp. 20.

8- Wasser, C. H., 1982. Ecology and culture of selected species useful in revegetating disturbed lands in the West. Washington, Department of the Interior, Fish and Wildlife Service, Office of Biological Services, Western Energy and Land Use Team. pp. 375.