

تنوع الگوهای الکتروفورزی پروتئین زنجیره‌ای دانه در ماش

فرهاد قوامی*، عبدالمجید رضایی*، سیروس عبدمیثانی** و احمد ارزانی*

چکیده

تنوع الگوی پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه با استفاده از روش الکتروفورز ژل پلی‌اکریلامید در حضور سدیم دو دسیل سولفات و ارتباط احتمالی آنها با برخی صفات مورفولوژیک و فنولوژیک، در ۱۹۳ نمونه از کلکسیون ماش ایران مورد مطالعه قرار گرفت. الکتروفورز پروتئین‌های دانه شش الگوی متفاوت را آشکار ساخت، که تنها در ۲ نوار آلومین و ۴ نوار گلوبولین موجود در محدوده وزن مولکولی ۲۳۵۰۰ تا ۳۴۰۰۰ دالتون متفاوت بودند. الگوهای ۱ و ۲ فراوانی قابل توجهی داشتند ولی فراوانی سایر الگوها اندک بود و به احتمال قوی در زمانهای نزدیک‌تری در سیر تکامی ماش به وجود آمده‌اند. تجزیه خوشه‌ای کشورها و شهرها با استفاده از فراوانی زیر واحدهای آلومین و گلوبولین، حاکی از عدم ارتباط بین تنوع جغرافیایی با فواصل تشابه حاصل از فراوانی زیر واحدها بود. همبستگی صفات مورفولوژیک با زیرواحدهای آلومین و گلوبولین نشان‌دهنده ارتباط میان زیرواحدهای G_1 و G_2 با روز تا شروع رسیدگی و همچنین وزن هزاردانه بود. بنابراین، انتخاب بر اساس الگوی پروتئینی در مراحل اولیه برنامه‌های به نژادی می‌تواند در افزایش عملکرد و زودرسی مؤثر واقع شود.

واژه‌های کلیدی - آلومین، الکتروفورز پروتئین دانه، تجزیه خوشه‌ای، تنوع ژنتیکی، گلوبولین، ماش

مقدمه

اکثر صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیکی که در روشهای متداول رده‌بندی مورد بررسی قرار می‌گیرند چندژنی بوده، تحت تأثیر شرایط محیطی قرار می‌گیرند. همچنین مطالعه تنوع ژنتیکی و تعیین پتانسیل ذخایر ژنتیکی به روشهای معمول و مرسوم مزرعه‌ای بسیار پرزحمت بوده، مساحت زیادی از اراضی را به خود اختصاص می‌دهد و وقت‌گیر می‌باشد. از این رو دانشمندان روش الکتروفورز پروتئین دانه را که دارای قدرت تشخیص و تمایز خوبی می‌باشد، به عنوان جایگزینی برای

روشهای قبلی ارائه داده‌اند. این روش بسیار مؤثرتر، ارزان‌تر و سریع‌تر از روشهای سنتی است و علاوه بر اینها از تغییرات محیطی تأثیر نگرفته، احتیاجی نیز به زمین و کارهای پرزحمت ندارد (۱).

از مزایای دیگر الکتروفورز پروتئین‌های دانه، کاربرد و اهمیت آنها در علوم طبقه‌بندی و فیلوژنتیکی است. در این مورد مطالب گسترده‌ای توسط سنگبوش (۱۷) جمع‌آوری گردیده است. او معتقد است چون صفات مورفولوژیک تولیدات نهایی

* - به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استاد و استادیار اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان
 ** - استاد اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران

این که ویگنارادیاتا و ویگنامانگو از دو فرم مجزا از ویگناسابلوباتا به نامهای ویگناسابلوباتا واریته سابلوباتا^۸ و ویگناسابلوباتا واریته سیلوستریس^۹ به وجود آمده‌اند، تایید نمود.

در آزمایش قابل ذکر دیگری که راثو و همکاران (۱۶) انجام دادند از الگوی الکتروفورزی گلوبولین دانه در تشخیص ۱۰ گونه از جنس ویگنا استفاده شد، که کاربرد مؤثری در مطالعه مخازن ژنتیکی این جنس دارد. در سال ۱۹۹۲ تحقیق بسیار ارزشمندی توسط توموکا و همکاران (۲۰) به منظور بررسی مرکز تنوع ژنتیکی و راههای انتشار ماش از طریق الکتروفورزی پروتئین دانه صورت گرفت. در این بررسی پروتئین‌های کلی (تام) دانه در ۵۸۱ رقم محلی ماش، که از کشورهای مختلف قاره آسیا جمع‌آوری گردیده بود، با استفاده از ژل پلی اکریلامید SDS با غلظت ۱۳/۵ درصد مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. هشت نوع الگوی پروتئینی بر پایه ترکیبات چهار نوار آلبومین و سه نوار گلوبولین تشخیص داده شد که در محدوده وزنی ۲۴ تا ۳۷ کیلو دالتون جداسازی گردیدند. الگوی پراکندگی جغرافیایی انواع پروتئین، نواحی متنوع ژنتیکی و دو مسیر انتشار برای ماش را آشکار ساخت. خاستگاه تنوع ژنتیکی که از این طریق به دست آمد آسیای غربی شامل ایران، افغانستان و عراق بود. همچنین دو مسیر احتمالی برای انتشار ماش از هند به مشرق، یکی از طریق کشورهای آسیای جنوب شرقی و دیگری جاده ابریشم ارائه شد که باعث انتشار ارقام از آسیای غربی و یا هند به چین و تایوان شده‌اند.

با توجه به این که در زمینه بررسی الگوهای الکتروفورزی پروتئین‌های دانه در ماش مطالعات اندکی صورت گرفته است و ژرم پلاسم ایران نیز از این نظر ناشناخته می‌باشد، این مطالعه به منظور بررسی قسمتی از این ژرم پلاسم از نظر الگوهای الکتروفورزی پروتئین‌های دانه و یافتن ارتباط احتمالی این

و غایی ژن‌ها می‌باشند که مسیر بیوشیمیایی پیچیده و متداخلی را طی می‌کنند، لذا تحت تأثیر یک سری از ژن‌ها و محرکهای بیرونی قرار دارند. بنابراین بجاست که پروتئین‌های دانه را که محصول اولیه ژن‌ها می‌باشند مورد مطالعه قرار داد.

الکتروفورزی پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه علاوه بر این که به عنوان یک وسیله مؤثر و قابل قبول در تشخیص ارقام بسیاری از گیاهان زراعی گزارش شده است (۲، ۱۱ و ۱۴)، روش بسیار قدرتمندی در یافتن مسیرها و چگونگی انتشار گونه‌های گیاهی نیز می‌باشد (۷). برای مثال گپتس و همکاران (۵) در سال ۱۹۸۸ با مطالعه الگوهای الکتروفورزی فازتولین^۱ در گونه‌های زراعی لوبیا دو مسیر را برای پراکنش آن از مراکز اصلی گیاه (آمریکای مرکزی و آند) به دیگر مناطق قاره آمریکا پیشنهاد کردند. در همان سال گپتس و بلیس (۴) با استفاده از همین روش توانستند مسیرهای فرضی بسیار قابل توجهی را برای انتشار لوبیای زراعی در اروپا و آفریقا ارائه دهند.

پروتئین‌های گیاهان تیره نخود چندشکلی^۲ بسیار قابل توجهی از لحاظ اندازه و بار نشان می‌دهند (۱) و از این چندشکلی در مطالعات بسیاری به منظور بررسی تنوع ژنتیکی در این تیره استفاده شده است (۶، ۱۵ و ۱۸). برای مثال کوئینگ و همکاران (۱۰) در بررسی الگوهای الکتروفورزی فازتولین در ۴۱ گونه وحشی و ۴۱ گونه زراعی لوبیا، تنوع گسترده‌ای را در ناحیه مرکزی آمریکا مشاهده نمودند. همچنین احتمال دادند که ارتباطی میان زیرواحدهای الگوی فازتولین B با برخی از خصوصیات نظیر اندازه دانه، زمان رسیدگی و مقاومت به برخی آفات وجود دارد.

نتایج تحقیق جامعی (۱۹) که با استفاده از الکتروفورزی SDS-PAGE^۳ با ژل ۱۲ درصد به منظور بررسی سیر تکاملی ویسیلین^۴ در ماش سبز^۵ و ماش سیاه^۶ و جد احتمالی آنها یعنی ویگناسابلوباتا^۷ انجام گرفت، نظریه جین و مهر (۸) را، دال بر

- | | | |
|--|---|---|
| 1- Phaseolin | 2- Polymorphism | 3- Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis |
| 4- Vicillin | 5- Green gram (<i>Vigna radiata</i>) | 6- Black gram (<i>V. mungo</i>) |
| 8- <i>V. sublobata</i> var. <i>sublobata</i> | 9- <i>V. sublobata</i> var. <i>silvestris</i> | 7- <i>V. sublobata</i> |

الگوها با خصوصیات مورفولوژیک و فنولوژیک طراحی گردید.

مواد و روشها

ژنوتیپها

ژنوتیپ‌های مورد بررسی، ۱۹۳ نمونه از کلکسیون ماش طرح حبوبات دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران بودند که ۹۴ رقم آن از ایران و بقیه نیز از کشورهای آمریکا، افغانستان، پاکستان، ترکیه و هند جمع‌آوری شده‌اند.

صفات مورفولوژیک و فنولوژیک

مطالعه خصوصیات فنولوژیک و مورفولوژیک در قالب طرح اگمنت^۱، همراه با سه شاهد (پرتو، گوهر و یک رقم محلی اصفهان) در ۱۰ بلوک انجام شد و صفات تاریخ ظهور اولین گل، ۵۰ درصد گلدهی، ظهور اولین غلاف، ۵۰ درصد غلاف‌دهی، شروع رسیدگی، ۹۰ درصد رسیدگی، تعداد غلاف در بوته، تعداد دانه در غلاف، طول غلاف، تعداد شاخه‌های جانبی، وزن هر دانه و عملکرد بوته یادداشت برداری گردید.

استخراج پروتئینها

برای استخراج پروتئین‌های تام از هر ژنوتیپ، یک دانه (حدود ۲۵ میلی‌گرم) توسط انبردستی و در داخل کاغذ تمیز و تاشده خرد و به خوبی آرد گردید. آرد حاصل در داخل لوله‌های درب‌دار پلاستیکی^۲ با حجم ۱/۵ میلی‌لیتر ریخته شد. به هر لوله ۸۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج تریس^۳ - اسید کلریدریک ۰/۰۵ مولار که شامل ۲ درصد SDS و ۵ مول اوره بود اضافه گردید و به هر نمونه مقدار ۲۰ میکرولیتر ۲- مرکاپتواتانول^۴ افزوده شد. نمونه‌ها به مدت یک ساعت در ۴ نوبت، به فاصله مساوی و رتکس^۵ گردیدند و سپس به مدت یک شب (۱۸-۱۲ ساعت) در دمای اتاق نگهداری شدند تا استخراج به طور کامل صورت پذیرد. برای استخراج آلبومین‌ها و

گلوبولین‌ها نیز ابتدا ۶-۴ عدد بذر در هاون چینی خرد شد و ۱۰۰ میلی‌گرم از آرد حاصل در لوله آزمایش مخصوص سانتریفوژ ریخته شد و جداسازی طبق دستورالعمل توموکا و همکاران (۲۰) انجام گرفت. رسوبهای آلبومین و گلوبولین هر کدام به ترتیب در ۵ و ۱ میلی‌لیتر از بافر استخراج، که در بالا توصیف شد، حل گردیدند. سپس به ترتیب مقدار ۱۰۰ و ۲۰ میکرولیتر از ۲- مرکاپتواتانول به آنها اضافه گردید.

آماده کردن کیت‌های کالیبراسیون^۶

برای مشخص کردن اندازه زیرواحدهای به دست آمده بایستی همراه نمونه از کیت‌های حامل پروتئین‌های با وزن مولکولی مشخص استفاده شود. بدین منظور از کیت‌های کالیبراسیون با وزن مولکولی کم، تهیه شده توسط شرکت فارماسیا^۷ (جدول ۱)، استفاده گردید و طبق دستورالعمل موجود برای بار کردن^۸ آماده شد.

الکتروفورز

الکتروفورز نمونه‌ها توسط ژل SDS-PAGE با غلظت ۱۳/۵ درصد، با استفاده از روش لایملی (۱۳) که توسط فولینگتن و همکاران (۳) تعدیل گردیده است، انجام گرفت. در درون هر چاهک مقدار ۱۵ میکرولیتر از هر نمونه تزریق و الکتروفورز به مدت ۶/۵ تا ۷ ساعت و با ولتاژ ثابت ۱۵۰ ولت انجام گردید. لازم به ذکر است که هر یک از ژنوتیپ‌ها حداقل ۲ بار تحت تجزیه و تحلیل الکتروفورزی قرار گرفتند تا از خلوص بذور و ثابت بودن نوارها در آنها اطمینان حاصل شود.

تجزیه و تحلیل آماری

به منظور بررسی یکنواختی زمین، خصوصیات ارقام شاهد به عنوان تیمار در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با استفاده از نرم‌افزار اس.ا.اس^۹ و برنامه تجزیه واریانس آنوا^{۱۰} مورد تجزیه

1- Augmented design

2- Ependorf

3- Tris

4- Mercapto ethanol

5- Vortex

6- Calibration kits

7- Pharmacia

8- Loading

9- Statistical Analysis System (SAS), 1993

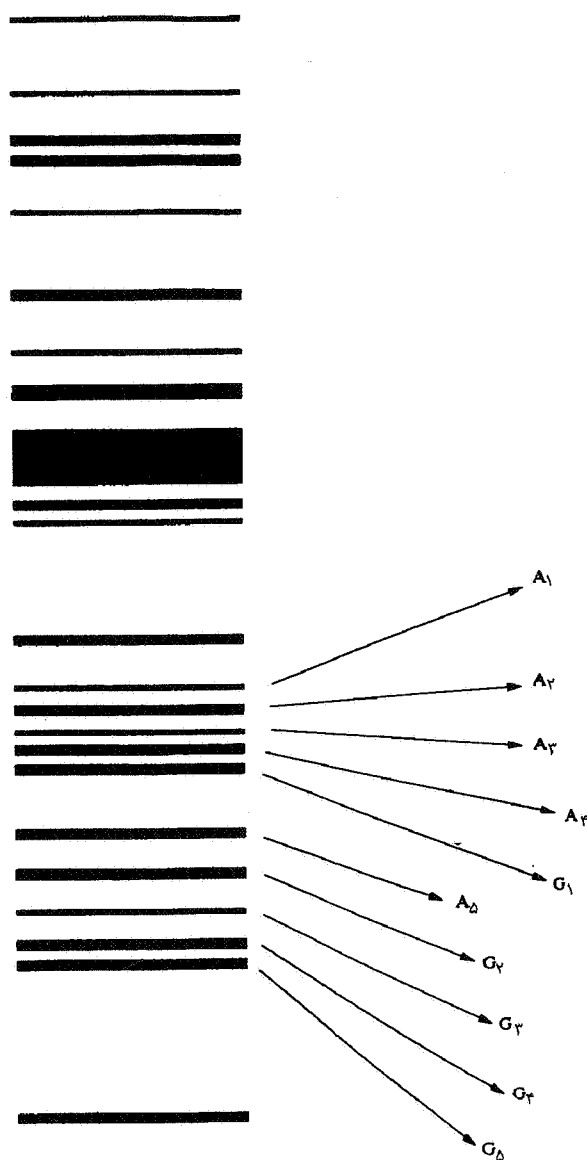
10- ANOVA

عمومی^۳ انجام شد. میانگینها به روش حداقل مربعات برآورد و توسط همین مدل مورد مقایسه قرار گرفتند.

نتایج و بحث

نتایج الکتروفورز پروتئین به روش SDS-PAGE روی ژنوتیپهای مورد بررسی، تعداد زیادی نوار بر روی ژل آشکار ساخت. تعداد نوارهای اصلی واضح و قابل رؤیت از ۱۸ تا ۲۱ عدد متغیر بود و تعداد کل آنها به ۲۳ عدد (شکل ۱) می‌رسید. علاوه بر نوارهای مذکور، تعدادی نوار ضعیف نیز در طول ژل پراکنده بودند. با استفاده از نمودار به‌دست آمده از کیت کالیبراسیون با وزن مولکولی کم، وزن مولکولی زیرواحدهای موجود با دقت خوبی ($R^2 = 0/998$) برآورد گردید (جدول ۲). الگوی الکتروفورزی به‌دست آمده از تمام ژنوتیپهای مختلف شباهت بسیاری را با یکدیگر نشان دادند، به طوری که نوارهای شماره ۱ تا ۱۴، ۲۰ و ۲۳ ثابت و بقیه متغیر بودند.

توموکا و همکاران (۲۰) در مطالعه ۵۸۱ رقم محلی ماش، اختلاف الگوی نوارها را در محدوده ۲۴۰۰۰ تا ۳۷۰۰۰ دالتون معرفی نمودند که مطابق با وزن مولکولی نوارهای شماره ۱۳ تا ۲۲ در ژنوتیپهای این مطالعه می‌باشد. لذا نوارهای مشاهده شده در این فاصله (۲۳۵۰۰ تا ۳۷۱۰۰ دالتون) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. جداسازی آلبومین‌ها و گلوبولین‌ها نشان داد که نوارهای شماره ۸ و ۹ از تجمع توأم زیرواحدهای آلبومینی و گلوبولینی به‌دست می‌آیند. همچنین با استفاده از این تجزیه نوع نوارهای به‌دست آمده در محدوده وزن مولکولی ۲۳۵۰۰ تا ۳۷۱۰۰ مشخص و ۱۰ نوار پروتئینی موجود در این محدوده به ۵ نوار گلوبولینی تفکیک گردید. نوارهای ۱۳ تا ۱۶ و ۱۸ آلبومین‌های ۱ تا ۵ (A۱ تا A۵) و نوارهای ۱۷ و ۱۹ تا ۲۲ گلوبولین‌های ۱ تا ۵ (G۱ تا G۵) نام گرفتند. در این میان نوارهای A۱ تا A۴، G۱، G۲ و G۵ مطابق با نوارهای به‌دست آمده در مطالعه توموکا و همکاران (۲۰) بوده و از لحاظ



شکل ۱- شمای کلی نوارهای پروتئینی دانه و زیر واحدهای آلبومین و گلوبولین جداسازی شده

قرار گرفتند. تجزیه خوشه‌ای برای شهرها و کشورها با روش متوسط گروهها، با تعیین ضرایب فاصله اقلیدسی و توسط نرم‌افزار اس. پی. اس. اس^۲ صورت گرفت. تجزیه واریانس الگوهای پروتئینی در قالب طرح کاملاً تصادفی با تکرار نامساوی توسط نرم‌افزار اس. ا. اس و برنامه مدل خطی

1- Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Averag

2- Statistical Program for Social Science (SPSS) for windows, Ver. 6, 1993.

3- General Linear Model

جدول ۱- مخلوط پروتئینی موجود در هر شیشه از کیت کالیبراسیون با وزن مولکولی کم

منبع	وزن مولکولی	نوع پروتئین
بافت ماهیچه‌ای خرگوش	۹۴۰۰۰	Phosphorylase b
سرم گاو	۶۷۰۰۰	Albumin
سفیده تخم مرغ	۴۳۰۰۰	Ovalbumin
اریتروسیت گاوی	۳۰۰۰۰	Carbonic Anhydrase
سویا	۲۰۱۰۰	Trypsin Inhibitor
شیر گاو	۱۴۴۰۰	α - Lactalbumin

وزن مولکولی نیز شباهت قابل قبولی با آنها نشان دادند.

وجود نوارهای اضافی A5، G3 و G4 ممکن است در اثر تفاوت‌های احتمالی در روش استخراج و یا غلظت SDS (۹)، تبدیل پلی پپتید سنگین تری به این پلی پپتید در اثر واکنشهای اندوپروتولیتیک (۱۹) و یا به احتمال ضعیف مقدار متفاوت آرد برای استخراج باشد. چهار الگوی متفاوت نواریندی برای آلبومین و سه الگوی متفاوت برای گلوبولین مشاهده گردید. بر اساس ترکیب این الگوها به طور کلی شش الگوی متفاوت الکتروفورزی در میان ژنوتیپ‌ها تشخیص داده شد (شکل ۲).

فراوانی الگو در کشورهای مختلف (جدول ۳) نشان داد که پاکستان با وجود تعداد اندک نمونه (۷ عدد) بالاترین تنوع را از نظر انواع الگوی پروتئینی دارد. پس از آن ایران با داشتن ۹۴ نمونه از لحاظ تنوع الگوی پروتئینی در مقام بعدی جای گرفت، که در آن فراوانی الگوهای ۱ و ۲ در حدود ۹۰ درصد بود و الگوهای ۴ و ۶ فراوانی اندکی را به خود اختصاص دادند. کشور هند با وجود این که به عنوان خاستگاه ماش شناخته شده است، ولی تنوع کمی از نظر الگوی پروتئینی داشت. علت این امر شاید کم بودن تعداد نمونه‌های مورد تجزیه از این کشور و یا نمونه‌های اندکی باشد که از این کشور در کلکسیون ماش ایران وجود دارد. با این وجود، نتایج با مشاهدات توموکا و همکاران (۲۰)، که در تجزیه الکتروفورزی پروتئین دانه ۲۴۶ نمونه از هند تنوع کمتری را نسبت به محدوده افغانستان، ایران و عراق (با ۵۳ نمونه) مشاهده نمودند و از این نظر این محدوده را به عنوان

مرکز تنوع ژنتیکی معرفی کردند، مطابقت دارد. در اینجا نیز بایستی گفت که محدوده ایران، پاکستان و افغانستان دارای بیشترین تنوع الگوی پروتئینی بوده و تمام الگوهای موجود را در ژنوتیپ‌های خود دارا می‌باشند.

در میان شهرهای ایران کرج بیشترین تنوع الگوی پروتئینی را نشان داد و تمام الگوهای مشاهده شده در کشور را دارا بود (جدول ۳). پس از کرج، ساری دارای تنوع بالایی بود و فراوانی تقریباً متعادلی را برای الگوی پروتئینی دانه نشان داد. با توجه به الگوهای به دست آمده برای شهرها و کشورها نمی‌توان هیچ مسیر خاصی را برای چگونگی پراکنش ماش در کشورهای مورد مطالعه و همچنین در داخل ایران ردیابی نمود. علت این امر را شاید بتوان به اندک بودن ژنوتیپ‌های آزمایشی در مورد کشورهای مختلف و همچنین غنی نبودن کلکسیون ایران از این بابت ربط داد. گیتس و همکاران (۶) در بررسی الگوهای الکتروفورزی لوبیا، فراوانی کمتری برای الگوی M نسبت به الگوهای C، H، A و S مشاهده نمودند و یکی از دلایل احتمالی آن را شکل‌گیری این الگو در زمانهای نزدیک‌تر و پس از زراعی شدن لوبیا دانسته‌اند. در مطالعه حاضر نیز احتمالاً الگوهای نوع ۱ و ۲ در مراحل ابتدایی سیر تکاملی ماش و الگوهای ۳، ۴، ۵ و ۶ در زمانهای نزدیک‌تر شکل گرفته‌اند. زیرا الگوهای ۱ و ۲ فراوانی قابل توجهی داشتند و در تمام کشورها و حتی شهرها قابل رؤیت بودند، اما الگوهای دیگر به طور پراکنده در مناطق مختلف دیده شدند. الگوی ۴ نیز به احتمال

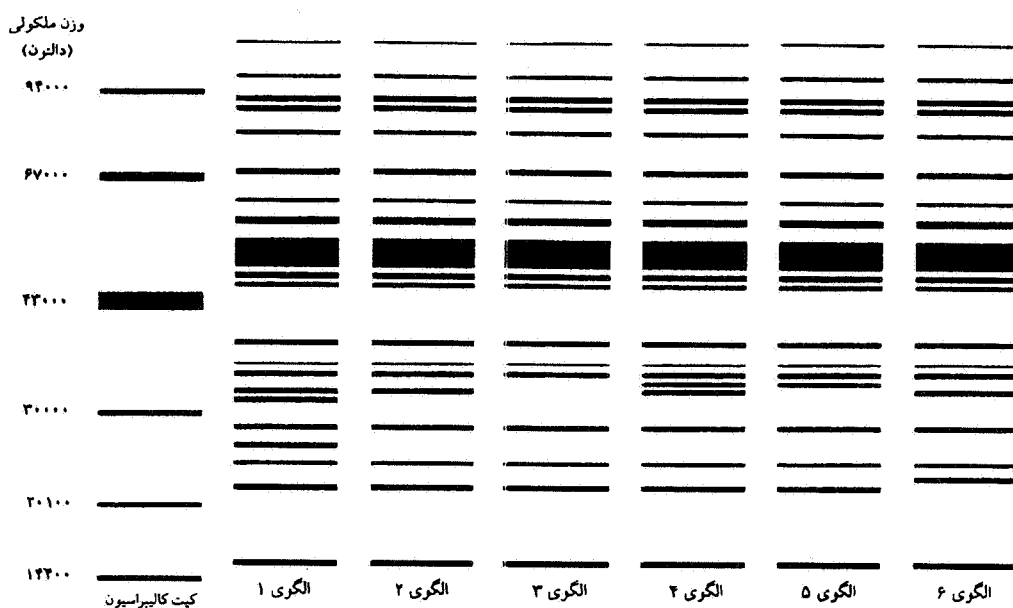
جدول ۲- برآورد میزان جرم مولکولی زیر واحدهای حاصل از الکتروفورز پروتئین های کلی دانه

جرم مولکولی برآورد شده (دالتون)	لگاریتم جرم مولکولی برآورد شده	مقدار مهاجرت (سانتیمتر)	زیر واحد
۱۰۶۵۰۴	۵/۰۲۷	۰/۳۵	۱
۹۲۱۲۴	۴/۹۶۴	۱/۱۰	۲
۸۷۷۷۶	۴/۹۴۳	۱/۳۵	۳
۸۵۲۶۶	۴/۹۳۱	۱/۵۰	۴
۷۸۹۱۸	۴/۸۹۷	۱/۹۰	۵
۷۰۲۷۱	۴/۸۴۷	۲/۵۰	۶
۶۵۰۴۰	۴/۸۱۳	۲/۹۰	۷
۶۱۹۷۰	۴/۷۹۲	۳/۱۵	۸
۵۳۶۰۲	۴/۷۲۹	۳/۹۰	۹
۵۰۰۹۴	۴/۷۰۰	۴/۲۵	۱۰
۴۸۶۶۲	۴/۶۸۷	۴/۴۰	۱۱
۴۰۴۹۴	۴/۶۰۷	۵/۳۵	۱۲
۳۷۱۱۹	۴/۵۷۰	۵/۸۰	۱۳
۳۵۷۱۰	۴/۵۵۳	۶/۰۰	۱۴
۳۴۰۲۵	۴/۵۳۲	۶/۲۵	۱۵
۳۳۰۵۲	۴/۵۱۹	۶/۴۰	۱۶
۳۲۷۳۴	۴/۵۱۵	۶/۴۵	۱۷
۲۹۱۴۷	۴/۴۶۵	۷/۰۵	۱۸
۲۷۷۷۱	۴/۴۴۴	۷/۳۰	۱۹
۲۵۴۵۷	۴/۴۰۶	۷/۷۵	۲۰
۲۴۰۲۲	۴/۳۸۱	—	۲۱*
۲۳۵۶۱	۴/۳۷۲	۸/۱۵	۲۲
۱۵۲۴۸	۴/۱۸۳	۱۰/۴۰	۲۳

* - زیر واحد ۲۱ تنها در دو ژنوتیپ دیده شد و جرم مولکولی آن از ژل دیگری برآورد گردید، لذا مقدار مهاجرت آن ذکر نگردیده است.

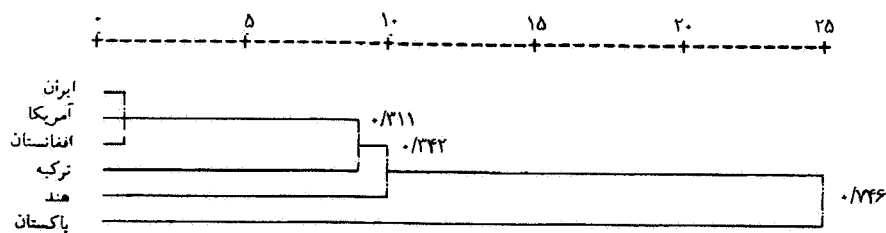
نمودار درختی حاصل از تجزیه خوشه‌ای کشورها با استفاده از فراوانی نوارهای آل‌بومین و گلوبولین در شکل ۳ نشان داده شده است. با قطع نمودار درختی در فاصله اقلیدسی ۰/۳۴۲، دو گروه مشاهده گردید. گروه اول شامل کشورهای ایران، آمریکا،

قوی در زمانهای دورتری نسبت به الگوهای ۳، ۵ و ۶ شکل گرفته است، زیرا فراوانی بالایی را در هند دارد و به احتمال قوی ژنوتیپ‌های واجد این الگو از آنجا به ایران، پاکستان و افغانستان وارد گردیده‌اند.



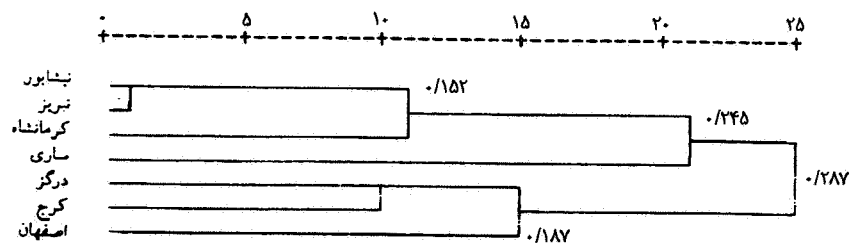
شکل ۲- الگوهای متفاوت الکتروفورزی مشاهده شده در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه (الگوی سمت چپ مربوط به پروتئین‌های استاندارد می‌باشد)

فاصله تشابه تغییر یافته



شکل ۳- نمودار درختی کشورهای مورد مطالعه بر اساس فراوانی نوارهای آلبومین و گلوبولین

فاصله تشابه تغییر یافته



شکل ۴- نمودار درختی شهرهای مورد مطالعه بر اساس فراوانی نوارهای آلبومین و گلوبولین

جدول ۳- منشاء، تعداد نمونه و انواع الگوهای پروتئینی در کشورهای و شهرهای مختلف

منشاء	تعداد نمونه					
	۱	۲	۳	۴	۵	۶
کشورها						
ایران	۵۱	۳۶	۰	۵	۰	۲
افغانستان	۹	۱۰	۰	۱	۰	۰
آمریکا	۱۲	۱۲	۰	۰	۰	۰
پاکستان	۱	۲	۱	۲	۱	۰
ترکیه	۴	۱	۲	۰	۰	۰
هند	۲۹	۵	۰	۷	۰	۰
شهرها						
اصفهان	۱۰	۴	۰	۰	۰	۰
تبریز	۶	۶	۰	۰	۰	۰
دره گز	۸	۵	۰	۱	۰	۰
ساری	۶	۴	۰	۳	۰	۰
کرج	۹	۳	۰	۱	۰	۱
کرمانشاه	۵	۶	۰	۰	۰	۱
نیشابور	۷	۸	۰	۰	۰	۰
کل	۱۰۶	۶۶	۳	۱۵	۱	۴

جدول ۴- ضرایب همبستگی^۱ نوارهای آلومین و گلوبولین^۲ با صفات کمی

صفات	A _۲	A _۳	G _۱	G _۲	G _۴	G _۵
روز تا اولین گلدهی	-۰/۰۴۵	۰/۰۴۲	-۰/۰۹۰	-۰/۰۹۰	۰/۰۲۲	-۰/۰۲۲
روز تا ۵۰% گلدهی	۰/۰۳۹	-۰/۰۲۵	-۰/۰۹۵	-۰/۰۹۵	-۰/۰۰۴	۰/۰۰۴
روز تا اولین غلاف دهی	-۰/۰۴۷	۰/۰۵۵	-۰/۱۰۷	-۰/۱۰۷	-۰/۰۱۰	۰/۰۱۰
روز تا ۵۰% غلاف دهی	-۰/۰۱۴	-۰/۰۴۳	-۰/۱۳۷	-۰/۱۳۷	-۰/۰۱۰	۰/۰۱۰
روز تا شروع رسیدگی	۰/۰۱۶	-۰/۰۲۸	-۰/۱۷۵	-۰/۱۷۵	۰/۰۲۴	-۰/۰۲۴
روز تا ۹۰% رسیدگی	-۰/۰۱۷	۰/۰۰۱	-۰/۱۲۰	-۰/۱۲۰	-۰/۰۲۶	۰/۰۲۶
تعداد غلاف در بوته	-۰/۰۰۵	-۰/۰۳۳	-۰/۰۸۶	-۰/۰۸۶	-۰/۰۱۸	۰/۰۱۸
تعداد دانه در غلاف	-۰/۰۴۱	۰/۰۸۵	۰/۰۰۴	۰/۰۰۴	۰/۰۳۶	-۰/۰۳۶
طول غلاف	۰/۰۰۹	۰/۰۷۴	۰/۲۱۰	۰/۲۱۶	-۰/۰۱۱	۰/۰۱۱
تعداد شاخه های جانبی	۰/۰۵۹	-۰/۰۷۰	-۰/۰۲۶	-۰/۰۲۶	-۰/۰۳۳	۰/۰۳۳
وزن هزار دانه	-۰/۰۲۱	۰/۱۰۵	۰/۲۱۸	۰/۲۱۸	-۰/۰۶۲	۰/۰۶۲
عملکرد بوته	۰/۰۰۵	۰/۰۵۷	۰/۰۱۵	۰/۰۱۵	-۰/۰۳۸	۰/۰۳۸

۱- ضرایب همبستگی بزرگتر از ۰/۱۳۸ و کوچکتر از ۰/۱۳۸- در سطح احتمال ۵ درصد و ضرایب همبستگی بزرگتر از ۰/۱۸۱ و کوچکتر از ۰/۱۸۱- در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار می باشند.

۲- نوارهای آلومین و گلوبولین ذکر نشده ثابت بوده و دارای واریانس صفر می باشند، لذا در جدول ضرایب همبستگی آورده نشده اند.

تنوع الگوهای الکتروفورزی پروتئین ذخیره‌ای دانه در ماش

جدول ۵- تجزیه واریانس^۱ و مقایسه میانگینهای^۲ الگوهای الکتروفورزی ژئوتیپ‌های مورد مطالعه

صفات	میانگین مربعات				
	الگوی	الگوی	الگوی	الگوی	الگوی
	۶	۵	۴	۳	۲
روز تا اولین گلدهی	۷۲/۵۰	۷۵/۰۰	۶۹/۲۷	۶۶/۳۳	۷۲/۲۹
روز تا ۵۰٪ گلدهی	۷۸/۰۰	۸۲/۰۰	۷۹/۰۰	۷۸/۶۷	۷۹/۴۸
روز تا اولین غلاف‌دهی	۷۶/۵۰	۷۸/۰۰	۷۴/۴۰	۷۱/۳۳	۷۷/۳۸
روز تا ۵۰٪ غلاف‌دهی	۸۴/۰۰	۸۸/۰۰	۸۴/۰۷	۸۵/۶۷	۸۵/۷۴
روز تا شروع رسیدگی	۱۰۲/۵۰	۱۰۵/۰۰	۱۰۱/۲۰	۱۰۱/۳۳	۱۰۲/۴۸
روز تا ۹۰٪ رسیدگی	۱۱۱/۰۰	۱۱۶/۰۰	۱۱۱/۹۳	۱۱۱/۳۳	۱۱۳/۷۷
تعداد غلاف در بوته	۴۴/۸۰	۳۵/۸۰	۴۸/۹۶	۵۹/۴۰	۵۰/۹۷
تعداد دانه در غلاف	۸/۰۹	۷/۲۷	۷/۵۶	۶/۹۵	۷/۷۴
طول غلاف	۶/۵۱	۶/۲۳	۶/۶۷	۶/۱۲	۶/۳۴
تعداد شاخه‌های جانبی	۶/۴۰	۶/۴۰	۶/۸۱	۷/۲۰	۶/۶۲
وزن هر دانه	۲۴/۲۷ ^{ab}	۱۸/۸۶ ^{ab}	۳۰/۰۰ ^{ab}	۲۴/۶۱ ^{ab}	۲۷/۵۵ ^b
عملکرد بوته	۹/۹۷	۵/۵۵	۱۲/۷۸	۱۱/۲۸	۱۲/۱۸
					۱۲/۳۱
					۳۱/۷۹ ^a
					۸۴/۹۴
					۰/۵۵
					۰/۸۲
					۱/۲۹
					۴۸۱/۱۵
					۳۷/۴۰
					۳۳/۴۴
					۱۰۰/۲۲
					۸۳/۸۶
					۷۵/۰۶
					۵۴/۲۵
					۴۳/۷۹
					۶۳/۷۳
					۶۱/۶۰

۱- درجه آزادی ژئوتیپ‌های داخل الگوها ۱۸۷ می‌باشد.

۲- در هر ردیف و برای هر صفت میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند بر مبنای میانگین‌های حداقل مربعات، در سطح احتمال ۵ درصد فاقد تفاوت معنی‌دار می‌باشند.

* - معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد

و گلوبولین کوچک و غیرمعنی دار می باشد، ولی ارتباطات جالب و معنی داری در میان آنها به چشم می خورد که از جمله آنها می توان به همبستگی مثبت و معنی دار (در سطح احتمال ۱ درصد) نوارهای G₁ و G₂ با وزن هزاردانه و طول غلاف و همچنین همبستگی معنی دار آنها (در سطح احتمال ۵ درصد) با روز تا شروع رسیدگی اشاره نمود. نتایج تجزیه واریانس (جدول ۵) نیز نشان داد که اختلاف بین الگوهای پروتئینی مختلف تنها از نظر وزن هزاردانه معنی دار است. مقایسه میانگینهای وزن هزاردانه در الگوهای مختلف نشان داد که الگوهای ۱ و ۲ دارای اختلاف معنی دار می باشند، ولی اختلاف آنها با سایر الگوها معنی دار نیست.

با توجه به همبستگی منفی بین زیرواحدهای G₁ و G₂ با روز تا شروع رسیدگی و همچنین ارتباط قوی میان این زیرواحدها و وزن هزاردانه و از آن جایی که وزن هزاردانه از اجزای مهم عملکرد به حساب می آید، انتخاب بر اساس الگوهای پروتئینی حاوی این نوارها در مراحل اولیه به نژادی می تواند در انتخاب گیاهان پرعملکرد و زودرس مؤثر واقع شود. با این وجود پیشنهاد می شود که صحت این ارتباط در طی چندین نسل و از طریق دورگگیری والدین واجد و فاقد این نوارها مورد بررسی قرار گیرد.

افغانستان، ترکیه و هند بود که در آنها نوارهای G₁ و G₂ حداکثر فراوانی را نشان دادند و سایر الگوها دارای فراوانی ناچیز بودند. گروه ۲ تنها شامل کشور پاکستان بود که فراوانی متعادلی را برای اکثر الگوها به جز الگوی ۶ نشان داد و از این نظر به مقدار خیلی زیادی از گروه اول فاصله داشت. نمودار درختی حاصل از تجزیه خوشه‌ای شهرها (شکل ۴) با استفاده از فراوانی نوارهای آلومین و گلوبولین سه گروه را تشکیل داد. گروه اول شامل نیشابور، تبریز و کرمانشاه، گروه دوم شامل ساری و گروه سوم شامل درگز، کرج و اصفهان بود. عامل تفکیک در این جا نیز فراوانی نوارهای G₁ و G₂ بود که در گروههای مختلف به طور محسوسی تفاوت داشتند. آنچه از تجزیه خوشه‌ای شهرها و کشورها استنباط می شود، عدم ارتباط بین الگوی جغرافیایی با فواصل حاصل از فراوانی زیرواحدهای پروتئینی دانه می باشد. با آن که در برخی موارد ارتباط بین الگوهای الکتروفورزی پروتئین دانه و صفات مورفولوژیک مورد بررسی قرار نگرفته (۱۸، ۲۰) و یا مشاهده نشده است (۱۲)، ولی گزارشهای مختلفی نیز دال بر وجود ارتباط بین برخی الگوها و صفاتی نظیر زمان رسیدگی و اندازه دانه (۱۰) و یا مقاومت به آفت (۱۵) به چشم می خورد. همان طور که از جدول ۴ مشهود است، ارتباط میان اکثر صفات مورفولوژیک و نوارهای آلومین

منابع مورد استفاده

1. Cooke, R.J. 1988. Electrophoresis in plant testing and breeding. Adv. in Electrophoresis 2: 171-261.
2. Ferguson, J.M. and D.F. Grabe. 1986. Identification of cultivars of perennial ryegrass by SDS-PAGE of seed proteins. Crop Sci. 26:170-176.
3. Fullington, J.G., E.W. Cole and D.D. Kasarda. 1983. Quantitative sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis of total proteins extracted from different wheat varieties: Effect of protein content. Cereal Chem. 60:65-71.
4. Gepts, P. and F.A. Bliss. 1988. Dissemination pathways of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae) deduced from phaseolin electrophoretic variability. II. Europe and Africa. Econ. Botany 42:86-104.
5. Gepts, P., J. Kmiecik, P. Pereira and F.A. Bliss. 1988. Dissemination pathways of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae) deduced from phaseolin electrophoretic variability. I. The Americans. Econ. Botany 42:73-85.
6. Gepts, P., T.C. Osborn, K. Rashka and F.A. Bliss. 1986. Phaseolin-protein variability in wild forms and landraces of the common bean (*Phaseolus vulgaris*): Evidence for multiple centers of domestication.

- Econ. Botany 40:451-468.
7. Hymowitz, T. and N. Kaizuma. 1980. Dissemination of soybean (*Glycine max*): Seed protein electrophoresis profiles among Japanese cultivars. Econ. Botany 33:311-319.
 8. Jain, H.K. and K.L. Mehra. 1980. Evolution, adaptation, relationships. and uses of the species of *Vigna* cultivated in India. pp. 459-468. In: R.Y. Symmerfield and A.H. Bunting (Eds). Advances in Legume Science. Royal Botanic Garden, Kew, England.
 9. Jensen, U. and B. Grumpe. 1983. Seed storage proteins. pp. 238-254. In: U. Jensen and D.E. Fairbrothers (Eds). Proteins and Nucleic Acids in Plant Systematics. Springer-Verlag Inc., Berlin.
 10. Koenig, R.L., S.P. Singh and P. Gepts. 1990. Novel phaseolin types in wild and cultivated common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). Econ. Botany 44:50-60.
 11. Krishnan, H.B. and D.A. Sleper. 1997. Identification of tall fescue cultivars by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis of seed proteins. Crop Sci. 37:215-219.
 12. Ladizinsky, G. 1975. Seed protein electrophoresis of the wild and cultivated species of section *Faba* or *Vicia*. Euphytica 24:785-788.
 13. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685.
 14. Lookhart, G.L. 1985. Identification of oat cultivars by combining polyacrylamide gel electrophoresis and reversed-phase high performance liquid chromatography. Cereal Chem. 62:345-350.
 15. Odeigah, P.G.C. and A.O. Osanyinpeju. 1996. Seed protein electrophoretic characterization of cowpea (*Vigna unguiculata*) germplasm from IITA gene bank. Genetic Resources and Crop Evolution 43: 458-491.
 16. Rao, R., M. Del Vaglio, M. Paino D'Urzo and L. Monti. 1992. Identification of *Vigna* spp. through specific seed storage polypeptides. Euphytica 62:39-43.
 17. Sengbusch, P.V. 1983. Protein characters and their systematic value. pp. 105-118. In: U. Jensen and D.E. Fairbrothers (Eds). Proteins and Nucleic Acids in Plant Systematics. Springer-Verlag Inc., Berlin.
 18. Sullivan, J.G. and G. Freytag. 1986. Predicting interspecific compatibilities in beans (*Phaseolus*) by seed protein electrophoresis. Euphytica 35:201-209.
 19. Thakare, R.G., J.D. Gadgil and R. Mitra. 1988. Origin and evolution of seed protein genes in *Vigna mungo* and *Vigna radiata*. pp. 47-52. In: S. Shanmugasundaram and B.T. McLean (Eds). Mungbean: Proc. of the 2nd Inter. Symp., AVRDC, Shanhua, Taiwan.
 20. Tomooka, N., C. Lairungreang, P. Nakeeraks, Y. Egawa and C. Thavarasook. 1992. Center of genetic diversity and dissemination pathways in mungbean deduced from seed protein electrophoresis. Theor. Appl. Genet. 83:289-293.