بررسی تنوع ژنتیکی لاین‌های سویا با استفاده از روش الکتروفورز پروتئین دانه

حمید علی‌پور[۱]، عبدالمجید رضایی[۱]، سیدعلی‌محمد میرمحمدی میبدی[۱] و مسعود طاهری[۲]

چکیده

این پژوهش به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ۲۷۰ ژنوتیپ سویا، از نظر الگوهای الکتروفورتیک پروتئین دانه، و ارتباط آنها با برخی از ویژگی‌های دانه مانند درصد روغن، درصد پروتئین، برخی از ترکیبات شیمیایی و وزن صد دانه انجام شد. از میان روش‌های الکتروفورز، غلظت‌های ۱۰ و ۴/۵ درصد اکریلامید به ترتیب برای ژل‌های اصلی و پایه، غلظت ۱۳/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بافر استخراج عصاره پروتئین، ۱۰ میکرولیتر تزریق نمونه در داخل چاهک‌های ژل، ۲/۵ میلی‌آمپر، و دو ساعت رنگ‌آمیزی، مناسب‌ترین تلفیق برای به دست آوردن نوارهای واضح و جداگانه پروتئینی تشخیص داده شد. نتایج الکتروفورز پروتئین‌ها، ۳۰ نوار را بر مبنای حرکت نسبی روی ژل آشکار ساخت، که تنها پنج عدد از آنها در میان ژنوتیپ‌ها چند شکلی نشان دادند. به طور کلی، هشت الگوی متفاوت الکتروفورتیک در میان ژنوتیپ‌ها تشخیص داده شد. تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها بر پایهٔ ارزیابی کیفی نوارهایی که چند شکلی نشان دادند آنها را در هشت گروه، و تجزیه خوشه‌ای نوارهای متغیر در ژنوتیپ‌ها آنها را در سه گروه جداگانه دسته‌بندی کرد. ضریب تطابق ساده میان نوارهای با حرکت ۲/۵ و ۴۹/۵ درصد برابر صفر بود، که بیانگر عدم ظهور هم‌زمان این دو نوار با هم می‌باشد. احتمالاً این نوارها توسط یک ژن کنترل می‌گردند، که در ژنوتیپ‌های هموزیگوت غالب و مغلوب به صورت یک نوار منفرد ظاهر شده و موقعیت متفاوتی را روی ژل پیدا می‌کنند. اختلاف میان الگوهای پروتئینی از نظر درصد پروتئین و درصد روغن دانه معنی‌دار بود. ضرایب هم‌بستگی میان نوارهای پروتئینی متغیر در ژنوتیپ‌ها و صفات مورد بررسی نشان داد که نوارهای پروتئینی با حرکت نسبی ۳/۵ و ۴۹/۵ درصد به ترتیب دارای هم‌بستگی مثبت و معنی‌دار با درصد پروتئین و فسفر دانه می‌باشند. ژنوتیپ‌های الگوهای پروتئینی دارای نوار با حرکت نسبی ۴۹/۵ درصد، بیشترین درصد فسفر دانه را داشتند. رنگ ناف دانه ژنوتیپ‌های حاوی نوار پروتئینی با حرکت نسبی ۵۲ درصد سیاه بود.

واژه‌های کلیدی: تجزیه خوشه‌ای، ترکیب شیمیایی دانه، ژرم‌پلاسم، هم‌بستگی صفات

مقدمه

اندیشه استفاده از فعالیت کاتالیزوری آنزیم‌ها با روش‌های بیوشیمیایی منجر به رفع مشکل نشانگرهای ژنتیکی از طریق روش الکتروفورز گردیده است (۶، ۹ و ۱۵). امروزه با گسترش روش‌های دیگر تجزیه و تحلیل ژنتیکی، که در آنها مستقیماً از

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استاد و استادیار اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان
۲. مربی اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1380.5.4.7.8]

ماده ژنتیکی (DNA) استفاده می‌شود، پژوهش‌های بسیار ارزشمندی در زمینه‌های گوناگون، از جمله ارتباطات فیلوژنتیکی و تکامل (۳، ۷ و ۱۰)، چگونگی روند زراعی شدن گیاهان و بررسی تنوع ژنتیکی (۷، ۱۱ و ۱۹)، تعیین نقشه‌های پیوستگی و ارائه نشانگرهای پیوسته با ژن‌های مقاومت نسبت به آفات و بیماری‌ها، و سرانجام تعیین مکان‌های ژنی مربوط به صفات کمی (۴، ۱۰ و ۱۲) به انجام رسیده و یا درحال انجام است. با این وجود، استفاده از الکتروفورز پروتئین‌های دانه به منظور تعیین و گروه‌بندی پلی‌پپتیدهای تشکیل دهندهٔ مولکول‌های پروتئینی، و شناسایی چند شکلی[1] آنها در میان ژرم‌پلاسم موجود از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است.

از الکتروفورز با ژل پلی‌اکریلامید در حضور سدیم دودسیل سولفات، در تشخیص واریته‌ها و طبقه‌بندی درون گونه‌ای و میان گونه‌ای محصولات گوناگون همچون بقولات استفاده شده است. سالمانویچ و پرزیبلیسکا (۱۸) آلبومین کلی دانه را در چند گونه نخود[2] با روش الکتروفورز مقایسه کردند، و نتیجه گرفتند که جنس سی‌سر[3] به خاطر الگوی پروتئینی متفاوت به یک طایفه جدید تک جنسی یا سی‌سرا[4] تعلق دارد. آزبورن و کمبل[5] (به نقل از ۸) سه بخش هموژن و قابل تمایز از پروتئین‌های دانه نخود فرنگی را جداسازی نمودند. از این سه بخش دو گلوبولین به نام‌های ویسیلین و لگومین نامیده شدند، و دیگری از آلبومین‌ها بود که گلوملین نام‌گذاری گردید.

میلرد و همکاران (۱۳) نیز جزء گلوبولین را از لپه‌های باقلا جداسازی کردند. به عقیده این پژوهشگران یک جزء، که نسبت بسیار کمی داشت، از پروتئین‌های با وزن ملکولی سبک است و منشأ سیتوپلاسمی دارد. دو جزء دیگر دارای وزن مولکولی سنگین و متوسط بودند و به ترتیب لگومین و ویسیلین می‌باشند. گودریچ و همکاران (۵) به این نتیجه رسیدند که وجود دگرگشنی در باقلا باعث تفاوت در الگوهای الکتروفورزی پروتئین‌های دانه‌های یک غلاف، و غلاف‌ها و بوته‌های مختلف در یک رقم گردیده است. پولیگنانو و همکاران (۱۶) نیز با بررسی الگوهای الکتروفورزی پروتئین‌های دانه در باقلا، تفاوت‌های بسیاری را در میان ژنوتیپ‌های گوناگون، و یکنواختی بسیاری را در داخل ژنوتیپ‌ها مشاهده نمودند. این پژوهشگران گزارش کردند که خالص‌سازی گلوبولین برای پی بردن به تفاوت زیرواحدها لازم نمی‌باشد، زیرا این تفاوت‌ها در الگوی نواری پروتئین‌های کلی دانه نیز مشهود است.

اودیگاه و اُسانینپجو (۱۴) با بررسی پروتئین کلی دانه و اجزای آلبومین و گلوبولین در ۲۰ نمونه لوبیا چشم بلبلی، دو الگوی اصلی را برای پروتئین کلی تشخیص دادند، که مربوط به زیرواحدهای ۲۹ و ۳۹ کیلودالتون بود، و تنها در شش ژنوتیپ موجود بود. این شش ژنوتیپ مقاوم به سوسک چند نقطه‌ای حبوبات بودند. این امر بر رابطهٔ این نوارها و مقاومت نسبت به آفت دلالت دارد.

براندا و اسن (۲) گلوبولین‌های شبیه ویسیلین، موسوم به بتا-کانگلایسین[6] را در سویا جداسازی نمودند، و نشان دادند که ظاهراً در شش فرم ایزومری با وزن ملکولی ۱۵۰ تا ۱۷۵ کیلودالتون یافت می‌شوند. در هر ایزومر کانگلایسین، یکی از سه زیرواحد آلفا، بتا و گاما تشخیص داده شده است. زیر واحدهای آلفا دارای ترکیب اسید آمینه‌ای همانند هستند، و وزن ملکولی ۵۴کیلو دالتون دارند. زیر واحدهای بتا و گاما به ترتیب دارای وزن ملکولی ۵۰ و ۴۲ کیلو دالتون می‌باشند. کان گلایسین‌ها بیشتر از نظر قند پایانه N و ترکیب اسیدهای آمینه‌ای تفاوت دارند. تمامی این زیرواحدها اسیدی و فاقد سیستئین و متیونین می‌باشند، و حدود ۳/۵-۵ درصد کربوهیدرات (مانوز و گلوکوزامین) دارند.

سات و همکاران (۲۰) گلایسین (۱۱S) و بتا-کانگلایسین (۷S) را پروتئین‌های اصلی سویا می‌دانند. گلایسین دارای وزن ملکولی ۳۵۰۰۰۰ می‌باشد، و دست کم از شش زیرواحد

1. Polymorphism 2. *Vicieae* 3. *Cicer* 4. *Cicereae* 5. Osborne & Campbell
6. β Conglicine

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1380.5.4.7.8]

گوناگون تشکیل شده است. هر یک از این زیرواحدها شامل یک پلی‌پپتید اسیدی است که توسط یک پیوند منفرد دی‌سولفیدی به یک پلی‌پپتید بازی متصل است. وزن مولکولی زیر واحدهای اسیدی ۳۷-۴۲ هزار، و زیرواحدهای بازی ۱۷-۲۰ هزار می‌باشد. بتا-کانگلایسین با وزن ملکولی تقریبی ۱۸۰۰۰۰، حداقل دارای چهار زیر واحد متفاوت (γ، β، α و α')، با وزن‌های ملکولی بین ۴۲ تا ۵۷ هزار می‌باشد. گلایسین و بتا- کانگلایسین هر دو هتروژن هستند. این هتروژنی ناشی از تغییراتی است که به همراه و بعد از ترجمه روی ملکول‌های اولیه اتفاق می‌افتد.

با توجه به مطالب یاد شده، این پژوهش به منظور بررسی تنوع ژنتیکی سویا با استفاده از روش الکتروفورز پروتئین‌های دانه طراحی گردید، که مهم‌ترین اهداف آن به شرح زیر می‌باشد:

الف) به دست آوردن روش عملی مناسب برای مشاهده نوارهای واضح و مجزای پروتئینی.

ب) تعیین نوارهای پروتئینی آشکار شده و بررسی تنوع الگوهای الکتروفورتیک.

ج) بررسی ارتباط احتمالی میان برخی از ترکیبات دانه و نوارهای پروتئینی دانه.

مواد و روش‌ها

ژنوتیپ‌های مورد بررسی شامل ۲۷۰ لاین داخلی و خارجی سویا، تهیه شده از کلکسیون مؤسسه اصلاح وتهیه نهال و بذر کرج بود. در این پژوهش از روش الکتروفورز در حضور سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE[1]) به منظور بررسی پروتئین کل و پروتئین‌های خاص استفاده شد. آنچه در زیر شرح داده می‌شود، روشی بهینه‌ای است که با بررسی غلظت‌های مختلف ژل آکریلامید[2] و بافر استخراج پروتئین، مقادیر متفاوت تزریق عصاره در چاهک، مدت زمان‌های متفاوت رنگ‌آمیزی و آمپرهای مختلف حاصل شده است.

برای ساختن ژل ۱۰ درصد آکریلامید در بررسی کل پروتئین‌ها، از مخلوط ۷/۵ میلی‌لیتر آب مقطر، شش میلی‌لیتر ذخیره یک (۲۹/۳ گرم آکریلامید و ۰/۸ گرم بیس‌آکریلامید[3] در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر)، ۴/۵ میلی‌لیتر ذخیره دو (۱۸/۱۷ گرم تریس[4] و ۰/۴ گرم SDS در ۵۰ میلی‌لیتر آب و اسیدیته ۸/۸)، ۸۰ میکرولیتر محلول آمونیم پرسولفات یک درصد و ۳۰ میکرولیتر تمد[5] استفاده شد. برای تهیه ژل ۴/۵ درصد، از آب مقطر، ذخیره‌های یک و سه، آمونیم پرسولفات و تمد به ترتیب به مقدار ۳/۶، ۰/۹ و ۱/۵ میلی‌لیتر و ۴۰ و ۲۰ میکرولیتر، استفاده گردید. ذخیره سه شامل ۶/۰۶ گرم تریس، ۰/۴ گرم SDS در ۵۰ میلی‌لیتر آب با اسیدیته ۶/۸ بود.

برای ساختن ژل ۱۰ درصد آکریلامید در بررسی پروتئین‌های خاص، از مخلوط ۱۹ میلی‌لیتر محلول آکریلامید (۱۶/۲ آکریلامید، ۵% بیس‌آکریلامید در ۹۰/۵ میلی‌لیتر آب مقطر)، ۱۲/۵ میلی‌لیتر بافر تریس (۲۰/۱۷ گرم تریس و ۵۰ میلی‌لیتر آب با اسیدیته ۸/۸ برای ژل اصلی و اسیدیته ۶/۸ برای ژل نگهدارنده)، ۰/۸ میلی‌لیتر آمونیم پرسولفات ۰/۵ درصد، ۱۵ میکرولیتر SDS ده درصد، و ۱۵ میکرولیتر تمد استفاده شد. برای تهیه ژل ۴/۵ درصد، مقدار آب مقطر، آکریلامید، بافر بیس، آمونیم پرسولفات، SDS و تمد به ترتیب ۷/۵، ۲/۷۵، ۱/۳ و ۰/۷۵ میلی‌لیتر و ۰/۱ و ۱۰ میکرولیتر بود.

برای تهیه بافر الکترود، در الکتروفورز کل پروتئین‌ها، از مخلوط ۳/۰۳ گرم تریس همراه با ۱۴/۴ گرم گلایسین، یک گرم SDS دریک لیتر آب مقطر با اسیدیته ۸/۳ استفاده شد. هم‌چنین، برای تهیه بافر الکترود (سه بار تغلیظ شده) در الکتروفورز پروتئین‌های خاص، از ۳/۱۵ گرم تریس، ۱۵/۱ گرم SDS و ۱۵/۱ گرم گلایسین در یک لیتر آب مقطر استفاده گردید. در بررسی کل پروتئین‌ها محلول رنگ‌آمیزی با اختلاط کوماسی بلو، متانول، اسید استیک و آب مقطر به ترتیب به مقدار ۰/۲۸۸ میلی‌گرم، ۴۸، ۱۲۰ و ۱۲۰ میلی‌لیتر و محلول رنگ‌زدایی با اختلاط ۱۲۰ میلی‌لیتر متانول، ۴۰ میلی‌لیتر اسید استیک و ۲۴ میلی‌لیتر آب مقطر به دست آمد. رنگ‌آمیزی و رنگ‌زدایی ژل به

1. Sodium Dodecyl Sulphate (SDS) 2. Acrilamid 3. Bis-Acrilamid 4. Tris 5. TEMED

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1380.5.4.7.8]

ترتیب به مدت ۲ و ۱۲ ساعت انجام، و سپس ژل در محلول اسید استیک هفت درصد برای عکس‌برداری نگهداری شد.

برای استخراج پروتئین‌های محلول در نمک طعام، ۱۳ میلی‌گرم از آرد ۲ تا۳ بذر تصادفی از هر لاین، با یک میلی‌لیتر محلول استخراج (تریس-HCl، pH = ۷/۵، NaCl ۰/۵ مولار) در داخل لوله‌های اپندورف به خوبی آمیخته شد. عصاره حاصل چندین مرتبه در دمای ۲۰°C- منجمد و سپس ذوب گردید، تا پروتئین‌های بیشتری شکسته و آزاد شوند (۱). پس از گذشت ۱۲ ساعت، نمونه‌ها با دور ۱۰۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد، پروتئین‌های کل استخراج و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

برای استخراج پروتئین‌های خاص نیز ۳۰ میلی‌گرم آرد در یک میلی‌لیتر محلول استخراج (۸ میلی‌لیتر آب مقطر، ۳/۴ میلی‌لیتر بافر استخراج سه بار تغلیظ شده و ۰/۶ میلی‌لیتر ۲-مرکاپتواتانول) به مدت یک ساعت چندین بار به هم زده شد، و پس از دو ساعت نگهداری در دمای اتاق، برای جدا شدن پروتئین‌های محلول در الکل با دور ۱۰۰۰۰rpm در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید. برای تهیه بافر استخراج سه بار تغلیظ شده، ۱۸/۷۵ میلی‌لیتر بافر تریس با pH=۶/۸، همراه با شش گرم SDS و ۲۵ میلی‌گرم کوماسی‌بلو آمیخته، و سپس ۳۰ میلی‌لیتر گلیسرول به آن اضافه شد.

برای این که حرکت پروتئین‌ها در داخل ژل مشخص باشد، نخست پروتئین‌های استخراج شده سنگین و رنگ‌آمیزی شد. بدین منظور از ۰/۰۰۲ درصد پودر آبی بروموفنل در محلول تریس اسید کلریدریک ۰/۰۶۲۵ مولار با pH ۶/۸، ۱۰ درصد گلیسرول و دو درصد سدیم دودسیل سولفات (گلیسرول و سدیم دودسیل سولفات به ترتیب سنگین کننده محلول و تخریب کننده پروتئین‌ها می‌باشند)، و نسبت‌های ۱/۲۵ میکرولیتر از ۲-مرکاپتواتانول، ۳/۷۵ میکرولیتر از محلول رنگی دای[1] و پنج میکرولیتر عصاره پروتئینی استفاده شد. در بررسی پروتئین‌های خاص، برای تهیه محلول رنگ‌آمیزی، ۳۷۵ میلی‌گرم کوماسی‌بلو، ۲۵۰ میلی‌لیتر اتانول، محلول ۶۰ گرم TCA (تری کلرواستیک اسید) در ۱۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۸۷/۵ میلی‌لیتر اسید استیک، و برای رنگ‌زدایی محلول ۶۰ گرم TCA در یک لیتر آب مقطر به کار رفت. پس از پلیمریزه شدن ژل نگهدارنده، از هر نمونه ۱۰ میکرولیتر با میکروپیپت به داخل چاهک‌ها تزریق گردید.

صفات مورد بررسی و محاسبات آماری

افزون بر الگوی نوارهای پروتئینی، چربی دانه با روش استخراج اتری عصاره، پروتئین با روش کلدال[2]، فسفر و گوگرد با روش اسپکتروفتومتری[3]، کلسیم با روش جذب اتمی، و مقدار ماده خشک دانه و وزن صد دانه نیز اندازه‌گیری شد. پس از رنگ‌آمیزی ژل، نوارهای پروتئینی برحسب حرکت نسبی (RM)[4] یا فاکتور وضوح (RF)[5]، به شرح زیر شناسایی گردیدند:

$$RF = RM = \frac{\text{حرکت پروتئین برحسب سانتی‌متر}}{\text{حرکت آبی بروموفنل برحسب سانتی‌متر}}$$

به منظور تجزیه کلاستر (تجزیه خوشه‌ای) و یافتن فاصله‌های ژنتیکی در ارزیابی کیفی، بسته به حضور یا عدم حضور پروتئین دریک جایگاه خاص، از کدهای یک و صفر استفاده گردید. سپس ماتریس داده‌ها تشکیل، و ماتریس فاصله ژنتیکی مستقیماً با نسبت شمار جفت‌های یک و صفر به شمار کل نوار مجاسبه شد. این روش محاسبه، شاخص قابل مقایسه‌ای با ضریب تطابق ساده[6] را برای فاصله ژنتیکی به دست می‌دهد (۱۷). فاصله‌های ژنتیکی با استفاده از روش تجزیهٔ خوشه‌ای UPGM[7] (۲۱) و ترسیم دندروگرام تجزیه و تحلیل شد. تفاوت میان الگوهای پروتئینی از نظر ویژگی‌های اندازه‌گیری شده مورد تجزیه واریانس قرار گرفت، و میانگین‌ها بر مبنای روش حداقل مربعات مقایسه شدند. سرانجام، ضرایب

1. Dye 2. Kjeldal 3. Spectrophotometric assay 4. Relative mobility 5. Resolution factor
6. Simple matching coefficient 7. Unweighted pair group method

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1380.5.4.7.8]

هم‌بستگی میان صفات، و میان الگوهای پروتئینی و صفات گوناگون محاسبه گردید.

نتایج و بحث

روش عملی مناسب الکتروفورز

نتایج نشان داد از میان شرایط و روش‌های مختلف بررسی شده، غلظت‌های ۱۰ و ۴/۵ درصد اکریلامید به ترتیب برای ژل‌های اصلی و پایه، غلظت ۱۳/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بافر استخراج عصاره پروتئین، ۱۰ میکرولیتر تزریق نمونه در داخل چاهک‌های ژل، ۲۵ میلی‌آمپر، و دو ساعت رنگ‌آمیزی، مناسب‌ترین تلفیق برای به دست آوردن نوارهای واضح و جداگانه پروتئینی می‌باشد. گلایسینین و بتا-کان گلایسینین، که از پروتئین‌های اصلی تشکیل دهنده سویا می‌باشند (۲۰)، دارای ساختمانی مرکب بوده و از چندین زیرواحد تشکیل شده‌اند. بنابراین، با توجه به شکل فضایی چند وجهی این پروتئین‌ها و تعدد زیرواحدهای تشکیل دهنده آنها، حرکت و جداسازی آنها در داخل ژل احتیاج به منافذ نسبتاً" بزرگ ژل دارد. انتخاب ژل پایه با غلظت ۴/۵ درصد و ژل اصلی با غلظت ۱۰ درصد، باعث شد که ابعاد پروتئین‌ها با قطر منافذ ژل متناسب گردد، و به خوبی در ژل اصلی حرکت کنند واز هم جدا شوند. از آن جایی که در میان حبوبات، سویا بیشترین مقدار پروتئین بذر (در حدود ۴۶ درصد) را دارا می‌باشد (۲)، در هم رفتن نوارهای پروتئینی و کشیدگی آنها در صفحه ژل در طی الکتروفورز تشدید می‌شود. انتخاب غلظت عصاره پروتئین (۱۳/۵ میلی‌لیتر) و میزان نمونه تزریقی داخل چاهک‌های ژل (۱۰ میکرولیتر) از در هم رفتن نوارهای پروتئینی و کشیدگی آنها جلوگیری نمود، و امکان حصول نوارهای واضح و جداگانه پروتئینی را فراهم ساخت.

تنوع الگوهای پروتئینی دانه

الکتروفورز پروتئین‌ها روی ۲۵۶ ژنوتیپ مورد بررسی شمار بسیاری نوار روی ژل آشکار ساخت. شمار نوارهای اصلی که واضح و قابل دیدن بودند از ۲۵ تا ۲۷ عدد متغیر بود، و شمار کل آنها به ۳۰ عدد می‌رسید. موقعیت نوارهای پروتئینی نسبت به یکدیگر و حرکت نسبی آنها در شکل ۱، و به طور شماتیک در شکل ۲ آورده شده است. افزون بر نوارهای یاد شده، شماری نوار ضعیف نیز در طول ژل پراکنده بودند. برای شناسایی بهتر نوارها و تعیین موقعیت هر نوار روی ژل، مقدار حرکت آبی بروموفنل برابر ۱۰۰ (یا یک) در نظر گرفته شد، و مقدار حرکت نسبی (RM یا RF) نوارهای آشکار شده تعیین گردید.

الگوهای الکتروفورتیک نشان داد که ژنوتیپ‌های گوناگون شباهت بسیاری با یکدیگر دارند، به طوری که تنها نوارهای با حرکت نسبی ۲/۵، ۳/۵، ۴۶، ۴۹/۵ و ۵۲ درصد متغیر بودند، و نوارهای دیگر در تمام ژنوتیپ‌ها ثابت می‌باشند. بر پایهٔ حضور یا عدم حضور این نوارها، هشت الگوی متفاوت الکتروفورتیک در میان ژنوتیپ‌ها تشخیص داده شد، که به ترتیب الگوهای ۱ تا ۸ نامیده شدند (جدول ۱). از ۲۵۶ ژنوتیپ مورد آزمایش به ترتیب ۲۲، ۷، ۴۸، ۱۴، ۵۱، ۲۳، ۷۱ و ۲۰ ژنوتیپ دارای الگوی پروتئینی ۱ تا ۸ بودند. بر پایهٔ ضریب تطابق ساده، بیشترین تشابه میان الگوهای «۱ و ۲۹»، «۳ و ۴»، «۶ و ۷» و «۵ و ۸» وجود داشت، و هیچ وجه تشابهی میان الگوهای «۴ و ۵»، «۱ و ۶»، «۲ و ۷» و «۳ و ۸» مشاهده نگردید. برای مثال، الگوهای ۶ و ۷ دارای نوارهای با حرکت نسبی ۴۶ و ۴۹/۵ درصد، و فاقد نوارهای ۲/۵ و ۵۲ درصد بودند، که الگوی نوع ۷ با فراوانی ۲۷/۷ و الگوی نوع ۲ با فراوانی ۲/۷۳ درصد، به ترتیب بیشترین و کمترین فراوانی را در میان ژنوتیپ‌ها داشتند. مقایسه نوارهای پروتئینی آشکار شده با نتایج سات و همکاران (۲۰) در شناسایی زیر واحدهای گلایسینین و بتا-کان گلایسینین مشخص نمود که نوارهای با حرکت نسبی ۲۶،۲۴ و ۳۵/۵ درصد (به ترتیب α' و α و β) متعلق به زیرواحدهای بتا-کان گلایسینین، و نوارهای با حرکت نسبی ۵۲ و ۷۶/۵ درصد مربوط به زیر واحدهای ۲-11S و ۱-11S گلایسینین هستند.

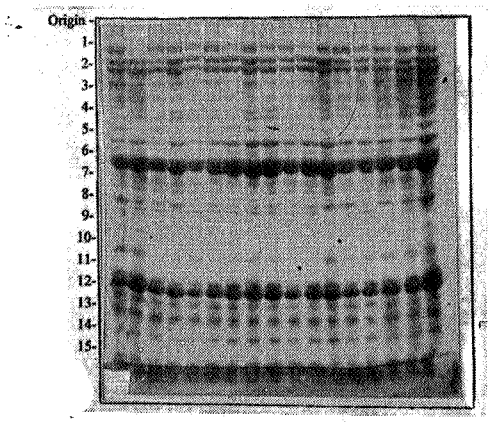
برش دندروگرام (شکل ۳) مربوط به ضرایب تطابق ساده،

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1380.5.4.7.8]

جدول ۱. الگوهای متفاوت ژنوتیپ‌ها از نظر پنج نوار پروتئینی و فراوانی آنها

نوع الگوها	حرکت نسبی نوار (RF×۱۰۰) ۲/۵	۳/۵	۴۶	۴۹/۵	۵۲	درصد فراوانی
۱	۱	۱	۰	۰	۱	۸/۵۹
۲	۱	۰	۰	۰	۱	۲/۷۳
۳	۱	۱	۱	۰	۰	۱۸/۷۵
۴	۱	۰	۱	۰	۰	۵/۴۶
۵	۰	۱	۰	۱	۱	۱۹/۹
۶	۰	۰	۱	۱	۰	۸/۹۸
۷	۰	۱	۱	۱	۰	۲۷/۷
۸	۰	۰	۰	۱	۱	۷/۸



شکل ۱. موقعیت نوارهای پروتئینی و حرکت نسبی آنها

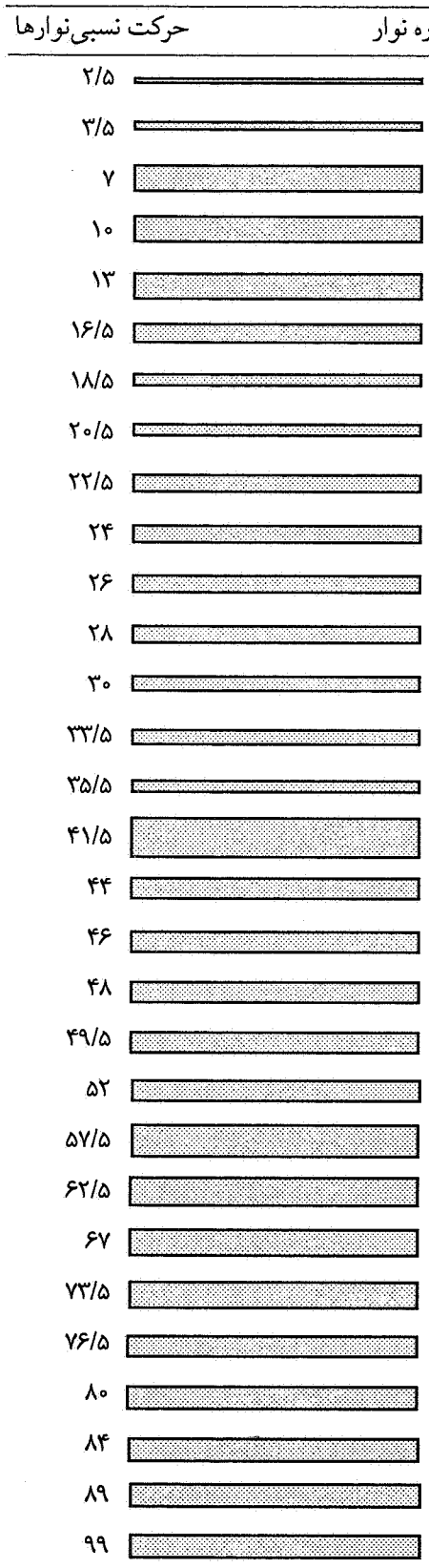
سه گروه متفاوت را از فاصله ۰/۴۲ نمایان ساخت. گروه یک متعلق به نوار ۱، گروه ۲ متعلق به نوارهای ۲، ۱۸ و ۲۰، و گروه ۳ متعلق به نوار ۲۱ است. با توجه به این‌که نوارهای ۲ و ۱۸ در بیشتر ژنوتیپ‌ها وجود دارند، و ضریب تطابق ساده میان آنها ۰/۵۲۵ است، می‌توان نتیجه گرفت که آنها دارای شباهت نسبتاً زیادی بوده و احتمالاً ژن‌های مربوط به آنها دارای پیوستگی متوسطی می‌باشند، به طوری که در بیشتر ژنوتیپ‌ها ظهور یکی همراه با ظهور دیگری و عدم ظهور یکی با عدم ظهور دیگری همراه است.

ضریب تطابق ساده ۰/۵ در میان نوارهای ۲، ۱۸ و ۲۰ می‌تواند بیانگر این نکته باشد که این سه نوار تقریباً در ۵۰ درصد ژنوتیپ‌ها با هم موجودند. ضریب تطابق ساده میان نوارهای ۱ و ۲۰ برابر صفر بود، که نشان دهندهٔ عدم ظهور هم‌زمان این دو نوار با هم است، بنابراین، استنباط می‌شود که ژن‌های مربوط به این دو نوار از هم مستقل هستند، و در صورت پیوسته بودن میزان نوترکیبی میان آنها ۵۰ درصد است. البته در صورتی این موضوع صادق است و ضریب تطابق ساده میان این دو نوار را توجیه می‌کند که سلول تخم از اتحاد گامت‌های نوترکیب به وجود آید، زیراگامت‌های والدینی حامل هر دو ژن مربوط به این نوارها می‌باشند. از سویی، می‌توان گفت که این دو نوار محصول پروتئینی یک ژن هستند، که در حالت هموزیگوس غالب و مغلوب به صورت یک نوار منفرد ظاهر می‌شوند. توجیه دوم در ارتباط میان این دو نوار منطقی‌تر به نظر می‌رسد.

به طور کلی، دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای نوارها بر دسته‌بندی آنها در سه گروه جداگانه دلالت دارد. با توجه به بالا بودن ضریب تطابق ساده نوارهای داخل هر گروه و فاصله قابل توجه آنها در میان گروه‌ها، می‌توان گفت که ژن‌های مربوط به نوارهای داخل هر گروه پیوستگی چشم‌گیری دارند، که بجز در

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1380.5.4.7.8]



شکل ۲. شمای کلی نوارهای پروتئینی

موارد اندک شکسته نمی‌شوند. از سوی دیگر، گروه‌های مختلف فاصله زیادی را نشان دادند، و ژن‌های مربوط به نوارهای پروتئینی آنها در فاصله دورتری از یکدیگر قرار گرفته‌اند، به طوری که نوترکیبی به راحتی در میان آنها اتفاق افتاده و ترکیب‌های متفاوتی را ایجاد می‌نماید.

مقایسه الگوهای پروتئینی از نظر برخی ویژگی‌های دانه

تجزیه واریانس الگوهای پروتئینی از نظر صفات مورد بررسی در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج مشخص نمود که اختلاف میان الگوهای پروتئینی از نظر وزن صد دانه معنی‌دار است. مقایسه میانگین‌های وزن صد دانه در الگوهای مختلف نشان داد که الگوهای ۴ و ۸ دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند، ولی تفاوت آنها با دیگر الگوها معنی‌دار نیست. اختلاف میانگین‌های وزن صد دانه الگوهای ۴ و ۱ از آن جا ناشی می‌شود که الگوی نوع ۴ تنها الگویی است که فقط دارای دو نوار پروتئینی با حرکت نسبی ۲/۵ و ۴۶ درصد از میان پنج نوار متغیر در ژنوتیپ‌ها می‌باشد، و در عین حال بیشترین وزن صد دانه را دارد. با توجه به ارتباط قوی الگوی نوع ۴ و وزن صد دانه، و از آن جایی که وزن صد دانه معیاری مهم در عملکرد دانه است، انتخاب بر اساس الگوی پروتئینی نوع ۴ در مراحل اولیه به‌نژادی می‌تواند در گزینش گیاهان پر عملکرد مؤثر واقع شود.

اختلاف میان الگوهای پروتئینی از نظر درصد کلسیم، درصد گوگرد و درصد ماده خشک دانه معنی‌دار نبود، ولی الگوی نوع ۴ که بالاترین درصد ماده خشک را داشت، کمترین درصد پروتئین دانه را دارا بود. این موضوع رابطه معکوس میان عملکرد و درصد پروتئین دانه را تأیید می‌کند.

اختلاف الگوها از نظر درصد فسفر بذر معنی‌دار گردید. الگوی نوع ۴ کمترین درصد فسفر را دارا بود. با توجه به این که الگوی نوع ۴ دارای کمترین میزان پروتئین در بین الگوها می‌باشد، و در ساختمان برخی از پروتئین‌ها و آنزیم‌ها، مانند سیتوکروم c، فسفر وجود دارد، کم بودن درصد فسفر ژنوتیپ‌های دارای این الگوی پروتئینی قابل انتظار است.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2026-11-26]

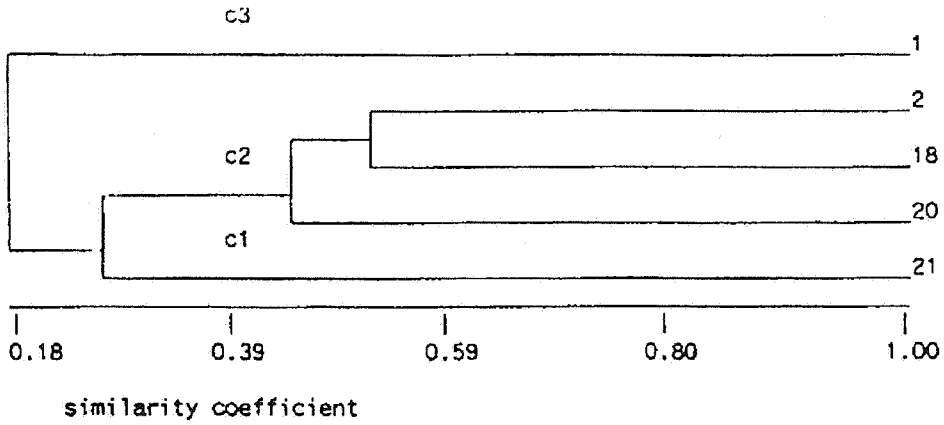
[DOR: 20.1001.1.22518517.1380.5.4.7.8]

جدول ۲. میانگین مربعات الگوهای الکتروفورتیک برای صفات گوناگون و مقایسه میانگین‌های الگوها[1]

صفت	میانگین مربعات الگوها	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸
وزن صد دانه	۸/۱۲*	۱۳/۲۴^{ab}	۱۲/۳۸^{ab}	۱۳/۱۹^{ab}	۱۳/۴۷^{a}	۱۲/۲۳^{ab}	۱۲/۹^{ab}	۱۳/۰۲^{ab}	۱۱/۸۴^{b}
درصد ماده خشک	۰/۵۳	۹۳/۲۵	۹۳/۵	۹۳/۱۲	۹۴/۵	۹۳/۲۵	۹۲/۸۷	۹۳/۲۵	۹۳/۸۷
درصد پروتئین دانه	۹۰/۵۷**	۳۷/۰۲^{a}	۳۳/۸^{bc}	۳۷/۵۱^{a}	۳۱/۱۲^{c}	۳۷/۰۶^{a}	۳۳/۲۳^{bc}	۳۴/۷^{ab}	۳۱/۳۷^{c}
درصد گوگرد دانه	۰/۰۰۵۵	۰/۴۳۸	۰/۵۱۸	۰/۵۰۶	۰/۵۹	۰/۵۲۷	۰/۵۹۵	۰/۵۰۵	۰/۴۸
درصد فسفر دانه	۰/۰۷۱*	۰/۸۷۵^{ab}	۰/۹^{ab}	۰/۸۷۵^{ab}	۰/۷۰۵^{b}	۱/۲۲۵^{a}	۱/۱۳۵^{ab}	۰/۹۵^{ab}	۱/۲۲۵^{a}
درصد روغن دانه	۱۱/۴۵**	۱۷/۴۷۵^{d}	۲۳/۲۹۵^{a}	۱۷/۲۱^{d}	۱۹/۳۶^{c}	۱۷/۲۲^{d}	۱۷/۲۹۵^{d}	۱۹/۰۷^{c}	۲۲/۱۷^{b}
درصد کلسیم دانه	۰/۰۰۰۲	۰/۰۲۳۹	۰/۰۲۴۸	۰/۰۳۳	۰/۰۳۳	۰/۰۳۱۴	۰/۰۲۲۱	۰/۰۳۶۲	۰/۰۲۴۲

۱. برای هر صفت میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، بر مبنای میانگین‌های حداقل مربعات، در سطح احتمال پنج درصد فاقد تفاوت معنی‌دار می‌باشند.

* و ** : به ترتیب معنی‌دار در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد.



شکل ۳. نمودار درختی نوارهای پروتئینی متغیر در ژنوتیپ‌ها

اختلاف الگوها از نظر درصد روغن بذر معنی‌دار شد، به گونه‌ای که ژنوتیپ‌های دارای الگوی پروتئینی نوع ۲ بیشترین میزان روغن را داشتند. از سویی، الگوی نوع ۲ تنها الگویی است که فاقد نوارهای پروتئینی با حرکت نسبی ۳/۵، ۴۶ و ۴۹/۵ درصد است. بنابراین، عدم وجود این سه نوار پروتئینی در ارتباط با درصد بالای روغن بذر می‌باشد. پس، انتخاب بر اساس الگوی نوع ۲ برای افزایش میزان روغن در مراحل اولیه به‌نژادی می‌تواند مؤثر باشد. نکته شایان توجه این است که ژنوتیپ‌های دارای الگوی نوع ۸، پس از الگوی نوع ۲ بیشترین میزان روغن را دارا هستند، و مقایسه نوارهای پروتئینی این دو الگو نشان داد که الگوی نوع ۸ فاقد دو نوار پروتئینی با حرکت نسبی ۳/۵ و ۴۶ درصد از میان نوارهای مربوط می‌باشد.

اختلاف الگوها از نظر درصد پروتئین دانه معنی‌دار شد، به طوری که الگوهای ۱، ۳ و ۵ دارای بالاترین میزان پروتئین بودند. این امر مؤید ارتباط قوی این الگوها و درصد پروتئین دانه است، که در ادامه مورد بحث قرار می‌گیرد.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1380.5.4.7.8]

جدول ۳. ضرایب هم‌بستگی میان ویژگی‌های دانه

	وزن صد دانه	ماده خشک	پروتئین	گوگرد	فسفر	روغن
ماده خشک	۰/۰۴					
پروتئین	۰/۱۷	-۰/۶۸*				
گوگرد	۰/۲۱	۰/۱	-۰/۴			
فسفر	-۰/۸۰**	-۰/۳۹	۰/۰۲	-۰/۰۷		
روغن	-۰/۵۳	۰/۴۸	۰/۶۰	-۰/۱۱	۰/۱	
کلسیم	۰/۳۶	۰/۱۹	۰/۲	۰/۱۲	-۰/۳۵	۰/۴۰

* و **: به ترتیب معنی‌دار در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد.

جدول ۴. هم‌بستگی نوارهای پروتئینی متغیر در ژنوتیپ‌ها و ویژگی‌های دانه

	حرکت نسبی نوار (RF × ۱۰۰)				
صفات	۲/۵	۳/۵	۴۶	۴۹/۵	۵۲
وزن صد دانه	۰/۵۴	۰/۲۵	۰/۶۷*	-۰/۵۴	-۰/۶۸*
درصد ماده خشک دانه	۰/۲۹	-۰/۴۹	-۰/۰۳	-۰/۲۹	۰/۰۳
درصد پروتئین دانه	۰/۱۶	۰/۸۸**	-۰/۱۴	-۰/۱۶	۰/۱۴
درصد گوگرد دانه	-۰/۱۴	-۰/۵۳	۰/۵۹	۰/۱۴	-۰/۵۹
درصد فسفر دانه	-۰/۸۴**	-۰/۰۳	-۰/۴۰	۰/۸۴**	۰/۴۰
درصد روغن دانه	۰/۰۹	-۰/۶۲	-۰/۴۰	-۰/۰۹	۰/۴۰
درصد کلسیم دانه	۰/۰۲	۰/۵۱	۰/۵۰	-۰/۰۲	-۰/۵۰

* و **: به ترتیب معنی‌دار در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد.

ارتباط میان الگوهای پروتئینی و برخی صفات دانه

هم‌بستگی میان صفات (جدول ۳) نشان داد که با افزایش درصد ماده خشک دانه درصد پروتئین کاهش می‌یابد. چنین رابطه‌ای از آن جا ناشی می‌شود که افزایش درصد ماده خشک، غلظت پروتئین را در واحد وزن کم کرده، و نهایتا" درصد پروتئین کاهش می‌یابد. هم‌بستگی وزن صد دانه و درصد فسفر دانه (۰/۸-) در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. با توجه به این که فسفر نسبت به دیگر عناصر معدنی (کلسیم، گوگرد) به میزان زیادی توسط گیاه جذب می‌شود و از عناصر ضروری برای رشد گیاه می‌باشد، بنابراین معنی‌دار بودن این هم‌بستگی منطقی به نظر می‌رسد. از سویی، افزایش وزن صد دانه، غلظت این عنصر را در دانه کاهش داده و متعاقبا" درصد آن کم می‌شود.

ارتباط میان بیشتر صفات و نوارهای پروتئینی کم و غیر معنی‌دار بود (جدول ۴)، ولی ارتباطات جالب و معنی‌داری در میان آنها به چشم می‌خورد، که از جمله می‌توان به هم‌بستگی مثبت و معنی‌دار نوارهای پروتئینی با حرکت نسبی ۳/۵ درصد و درصد پروتئین دانه اشاره نمود. زیاد بودن وزن مولکولی این نوار پروتئینی نسبت به نوارهای دیگر، وجود چنین ارتباطی را توجیه می‌کند. با توجه به این که الگوهای ۱، ۳، ۵ و ۷ بیشترین درصد پروتئین دانه را دارا هستند (جدول ۴)، و از سویی،

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1380.5.4.7.8]

تمامی این الگوها دارای نوار پروتئینی با حرکت نسبی ۳/۵ درصد می‌باشند، بنابراین ارتباط قوی میان درصد پروتئین دانه و نوار ۳/۵ درصد مورد تأیید قرار می‌گیرد. انتخاب بر اساس الگوهای پروتئینی حاوی این نوار می‌تواند در گزینش گیاهان با درصد بالای پروتئین بذر مؤثر واقع شود.

هم‌بستگی درصد فسفر دانه و نوارهای پروتئینی با حرکت نسبی ۲/۵ و ۴۹/۵ درصد (۰/۸۴) در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. الگوهای پروتئینی ۵، ۶، ۷ و ۸ با داشتن نوار با حرکت نسبی ۴۹/۵ درصد، بیشترین درصد فسفر دانه را دارا بودند (جدول ۴). در تعیین ارتباط صفات مورفولوژیک و نوارهای پروتئینی، نوار پروتئینی با حرکت نسبی ۵۲ درصد با رنگ ناف بذر مرتبط تشخیص داده شد. به طوری که ژنوتیپ‌های دارای این نوار پروتئینی رنگ ناف سیاه داشتند. بنابراین، می‌توان گفت ژن کد کننده پلی‌پپتید مربوط به این نوار پروتئینی کنترل کننده رنگ ناف بذر می‌باشد.

منابع مورد استفاده

۱. ولی‌زاده، م. و ت. کامیا. ۱۳۷۲. فاصله ژنتیکی بین گونه‌های یونجه با استفاده از بررسی چند شکلی‌های پروتئین و DNA. اولین کنگرهٔ علوم زراعی ایران، دانشگاه فردوسی مشهد.

2. Branda, H. U. and A. Esen. 1981. Heterogenity of soybean seed proteins. J. Agric. Food Chem. 29: 497-501.

3. Fatokun, C. A., D. Danesh, N. D. Young and E. L. Stewart. 1993. Molecular taxonomic relationships in the genus *Vigna* based on RFLP analysis. Theor. Appl. Genet. 86: 97-104.

4. Fatokun, C. A., D. I. Menancio-Hautea, D. Danesh and N. D. Young. 1992. Evidence for orthologous seed weight genes in cowpea and mungbean based on RFLP mapping. Genet. 132: 841-846.

5. Goodrich, W. J., R. J. Cooke and A. G. Morgan. 1985. The application of electrophoresis to the characterization of cultivars of *Vicia faba* L. Fabis Newsletter 13: 8-11.

6. Hames, B. O. and M. Richwood. 1990. Gel Electrophoresis of Proteins, A Practical Approach. Oxford University Press, UK.

7. Kaga, A., N. Tomooka, Y. Egawa, K. Hosaka and O. Kamijima. 1996. Species relationships in the subgenus Ceratotropis (genus *Vigna*) as revealed by RAPD analysis. Euphytica 88: 17-24.

8. Ma, Y. and F. A. Bliss. 1978. Seed proteins of common bean . Crop Sci. 18: 431-437.

9. Mac Donald, T. and J. L. Brewbaker. 1974. Isoenzyme polymorphism in flowering plants. J. Heredity 65: 37-42.

10. Maughan, P. J., M. A. Saghai Maroof and G. R. Buss. 1996. Molecular marker analysis of seed weight: Genomic locations, gene action, and evidence for orthologous evolution among three legume species. Theor. Appl. Genet. 93: 574-579.

11. Menancio-Hautea, D., C. A. Fatokun, L. Kumar, D. Danesh and N. D. Young. 1993. Comparative genome analysis of mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek) and cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walpers) using RFLP mapping data. Theor. Appl. Genet. 86: 797-810.

12. Mian, M. A. R., M. A. Bailey, J. P. Tamulonis, E. R. Shipe, T. E. Carter, W. A. Parrott, D. A. Ashley, R. S. Hussev and H. R. Boerma. 1996. Molecular markers associated with seed weight in two soybean populations. Theor. Appl. Genet. 93: 1011-1016.

13. Millerd, A., M. Simon and H. Stern. 1971. Legumine synthesis in developing cotyledons of *Vicia faba* L. Plant Physiol. 48: 419-425.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1380.5.4.7.8]

14. Odeigah, P. G. C. and A. O. Osanyinpeju. 1996. Seed protein electrophoretic characterization of cowpea (*Vigna unguiculata*). Genet. Resour. and Crop Evol. 43: 458-491.
15. Pasteur, N., G. Pasteur, F. Bonhomme, J. Catalan and J. B. Dawidian. 1988. Practical Isozyme Genetics. Ellis Harwood, New York.
16. Polignano, G. B., R. Splendido and P. Uggenti. 1991. Protein polymorphism among genotypes of faba bean from Afganistan and Ethiopia. Fabis Newsletter 28: 8-11.
17. Romesburg, H. C. 1990. Cluster Analysis For Researchers. Robert E. Krieger Publ. Co., Florida, USA.
18. Salmanowicz, B. P. and D. Krygier. 1992. Comparative study of seed albumins in the genus *vicia*. Genetica Polanica 33: 27-34.
19. Sarkar, R. and S. Bose. 1984. Electrophoretic characterization of rice varieties using single seed proteins. Theor. Appl. Genet. 68: 415-419.
20. Sathe, S. K., G. G. Lilley, A. C. Mason and C. M. Weaver. 1987. High-resolution sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis of soybean (*Glycine max* L.) seed proteins. Cereal Chem. 64: 380-384.
21. Sneath, P. H. A. and P. R. Sockal. 1973. Numerical Taxonomy. W. H. Freeman and Co., San Francisco, USA.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1380.5.4.7.8]