بررسی تنوع درون‌گونه‌ای و بین‌گونه‌ای گیاه فستوکا با استفاده از الگوی الکتروفورز پروتئین‌ها

سهیلا افکار[۱،*]، فرانک هادی[۲] و علی‌اشرف جعفری[۳]

۱- استادیار، گروه کشاورزی، دانشگاه پیام‌نور، تهران

۲- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد

۳- استاد، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۷/۰۵ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۲۴)

چکیده

فستوکا یکی از بزرگترین جنس‌ها از خانواده گراس‌ها است که بیش از ۶۰۰ گونه با سطح پلوئیدی متفاوت دارد. این مطالعه با هدف بررسی تنوع ژنتیکی ۲۲ ژنوتیپ از سه گونه فستوکا (*Festuca arundinacea*، *F.ovina* و *F.rubra*) با استفاده از الگوی الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر انجام شد. این گونه‌ها تنوع قابل‌توجهی در تعداد باندهای پروتئینی از ۱۳ - ۵ نشان دادند. بیشترین تعداد باند در G۱۷ (*F.rubra*) و کمترین تعداد باند پروتئینی در G۵ (*F.ovina*) مشخص شد. باند شماره ۱۴ کمیاب بود و فقط در G۳ در گونه *F.ovina* مشاهده شد که می‌تواند به‌عنوان یک باند اختصاصی برای شناسایی این ژنوتیپ در نظر گرفته شود. با توجه به نتایج تجزیه AMOVA سطح بالایی از تنوع ژنتیکی درون‌گونه‌ها نسبت به بین‌گونه‌ها وجود داشت که می‌تواند ناشی از ماهیت دگرگشنی در این جنس باشد. با توجه به اختلاف مشاهده شده در شاخص‌های تنوع بین سه گونه مورد مطالعه، مشخص شد که گونه‌ها دارای ساختار ژنتیکی متفاوتی هستند. نتایج تجزیه خوشه‌ای بر اساس الگوی پروتئین ذخیره‌ای بذر در ژنوتیپ‌های ارزیابی‌شده با استفاده از ماتریس فاصله اقلیدسی و روش UPGMA، ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را در چهار گروه قرار داد. کمترین ضریب تشابه بین G۱۴ و G۱۵ (*F.arundinacea*) با G۶ (*F.ovina*) وجود داشت، لذا می‌توان نتیجه گرفت گونه‌ها از روند تکاملی متفاوت‌تری تکامل یافته‌اند و بنابراین توصیه می‌شود به‌عنوان والد در تولید ارقام ترکیبی استفاده شوند. تنوع مشاهده شده در الگوی پروتئینی بذر گونه‌های فستوکا می‌تواند به‌علت هتروزیگوتی ناشی از دگرگشنی، تفاوت گونه‌ها یا جمع‌آوری جمعیت‌ها از مناطق متفاوت باشد.

واژگان کلیدی: تجزیه خوشه‌ای، تنوع ژنتیکی، گونه‌های فستوکا، نشانگر پروتئین، SDS-PAGE

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: **s.afkar@pnu.ac.ir**

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-20]

[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.2.3.9]

[DOI: 10.52547/pgr.8.2.4]

مقدمه

گراس‌های علوفه‌ای و چمنی در کشاورزی پایدار نقش مهمی دارند و کمک بزرگی به اقتصاد جهانی می‌کنند. آن‌ها نقش مهمی در تولید گوشت و لبنیات بازی می‌کنند و همچنین در حفاظت از خاک، حفاظت از محیط زیست و تفریح در فضای باز مهم هستند (Wang *et al*., 2001). فستوکا یکی از بزرگترین جنس‌ها در خانواده گراس‌ها است که بیش از ٦٠٠ گونه با سطح پلوئیدی مختلف از دیپلوئید (٢n = ١٢x = ١٤) تا دودکاپلوئید (٢n =١٢x = ٨٤) دارد (Tzveler, 1989; Gaut *et al*., 2000; Loureiro *et al*., 2007). گراس‌ها در اکوسیستم‌های مختلف وجود دارند و بسیاری از گونه‌های فستوکا از اهمیت زراعی زیادی برخوردار هستند (Masoumi *et al*., 2020). گراس‌ها تقریبا در٧٠ درصد از مناطق کشاورزی در جهان وجود دارند و بیشتر از ٥٠ درصد پروتئین‌های غذایی توسط آن‌ها تولید می‌شود (Kauppinen *et al*., 2016). گونه *F.rubra* از نظر رده‌بندی بسیار پیچیده بوده (Soreng *et al*., 2015; Cheng *et al*., 2016) و توزیع گسترده‌ای با تاریخچه تکاملی پیچیده‌ای دارد که ناشی از یخبندان‌های مختلف است (Inda *et al*., 2008). گونه *F.ovina* گراس دیپلوئید و چندساله‌ای است که در مناطق معتدل شمالی گسترش‌یافته است. این گونه از گراس، مقاوم به خشکی است که به مقدار کمی نیتروژن نیاز دارد و می‌توان از آن برای احیاء مراتع و احداث چراگاه‌های مصنوعی استفاده نمود (Weibull *et al*., 1991; Movahed *et al*., 2013) یکی از گونه‌های این جنس *Festuca arundinacea* (Tall Fescue) است که اهمیت اقتصادی داشته و به‌عنوان علوفه چهارپایان مصرف می‌شود (Tzveler, 1989; Gaut *et al*., 2000; Fu *et al*., 2016). این گونه به‌خوبی با کمبود آب سازگار شده است (Bughrara *et al*., 1991) و به‌طور گسترده به‌عنوان محصول علوفه‌ای فصل سرد در مناطق معتدل کشت می‌شود (Reed *et al*., 2004).

ارزیابی تنوع ژنتیکی موجود در جمعیت و ارقام می‌تواند به انتخاب ژنوتیپ‌ها برای توسعه واریته‌های اقتصادی در آینده کمک کند. تنوع موجود در محصولات جمع‌آوری‌شده از مناطق مختلف باید به درستی مشخص و ارزیابی شود تا استراتژی‌های لازم جهت حفاظت و بهره‌برداری رقم مورد نظر استفاده شود (Parashar *et al*., 2015; Sharma and Krishna, 2017). تعیین شباهت یا تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها و جمعیت‌هایی از گراس‌ها با استفاده از روش‌های مستقل از عامل‌های محیطی می‌تواند به فرآیند اصلاح و محافظت از تنوع زیستی کمک کند (Gilliland *et al*., 2000).

استراتژی‌های متعددی برای ارزیابی ژرم‌پلاسم اتخاذ شده است که از آن جمله می‌توان به استفاده از نشانگرهای ریخت‌شناسی (Kancherla and Bhalla, 2003)، نشانگرهای پروتئین ذخیره‌ای بذر و نشانگرهای مولکولی DNA اشاره کرد (Rahman and Hirata, 2004). روش‌های بیوشیمیایی مختلفی وجود دارند که امکان ارزیابی دقیق‌تر تنوع ژنتیکی را فراهم نموده و در بین این روش‌ها، تکنیک SDS-PAGE روشی ساده و اقتصادی است که به‌طور گسترده برای بررسی تنوع پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر محصولات زراعی استفاده می‌شود (Iqbal *et al*., 2005; Gholami Farahabadi *et al*., 2021). پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر بسیار مستقل از تغییرات محیطی هستند (Gepts, 1989; Kakaei and Kahrizi, 2011). الگوی پروتئین بذر تشابه ژنتیکی درون آرایه یا حتی بین موجودات مختلف را منعکس می‌کند (Mahmoud *et al*., 2006). نتایج بررسی تنوع ژنتیکی گونه‌های گیاه آگروپیرون با استفاده از الگوی پروتئین اطلاعات مهمی برای جمع‌آوری، محافظت ژنتیکی و طراحی برنامه‌های اصلاحی آینده فراهم کرده است.

در بررسی گیاه مرتعی آگروپیرون، تنوع ژنتیکی بالایی بین پانزده جمعیت وحشی آگروپیرون (*Agropyron desertorum*) جمع‌آوری شده از ایران مشاهده شد (Salehi Shanjani *et al*., 2015). نتایج بررسی جمعیت‌های خودروی *Agropyron cristatum* با استفاده از الگوی پروتئین بذر نشان داد که نشانگر پروتئینی با فاکتورهای اکوجغرافیایی همبستگی داشته و به‌تنهایی برای بررسی رده‌بندی این گونه قابل‌استفاده نیست. نتایج تنوع قابل

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-20]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.2.3.9]
[DOI: 10.52547/pgr.8.2.4]

ملاحظه‌ای را در پروتئین‌های بذر مربوط به جمعیت‌های مختلف *A. cristatum* نشان داد و پیشنهاد شد که این نشانگر به‌تنهایی نمی‌تواند برای بررسی رده‌بندی این گونه در سطح درون‌گونه‌ای استفاده شود و باید همراه با نشانگرهای رده‌بندی دیگر استفاده گردد (Yousofi *et al*., 2013). تجزیه خوشه‌ای چندین ژنوتیپ داخلی و خارجی گونه *F.arundinacea* بر اساس SDS-PAGE تنوع ژنتیکی کمی در سطح پروتئین نشان داد (Afkar *et al*., 2010). مطالعه حاضر با هدف بررسی تنوع ژنتیکی در ژنوتیپ‌های مختلف داخلی و خارجی از سه گونه فستوکا (*F.rubra, F.arundinacea, F.ovina*) با استفاده از الگوی پروتئین بذر با روش SDS-PAGE انجام شد.

مواد و روش‌ها

بذور ۲۲ ژنوتیپ از سه گونه *F.ovina*، *F.arundinacea* و *F.rubra* از مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور تهیه شدند (جدول ۱). بافر استخراج (گلیسین، تریس-HCl، گلیسیرین) بر اساس روش میرزایی ندوشن و همکاران (Mirzaei Nadoushan *et al*., 2002) آماده شد. استخراج پروتئین به روش گای و همکاران (Guy *et al*., 1992) انجام شد. پس از جداکردن پوشینه بذر به مقدار ۰/۲ گرم وزن و با ازت مایع در داخل هاون پودر شدند و به پودر حاصل مقدار ۳ میلی‌لیتر بافر استخراج اضافه شد. محلول همگن حاصل از مخلوط کامل محتویات هاون با بافر استخراج به اپندرف‌ها جهت سانتریفیوژ منتقل گردید. سانتریفیوژ اول به مدت ۲۰ دقیقه با ۱۰۰۰۰ (دور در دقیقه) در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد انجام شد. بخش مایع بالای اپندرف‌ها به دقت به اپندرف دیگر منتقل شد و سانتریفیوژ دوم به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ (دور در دقیقه) در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت.

مقدار پروتئین به روش برادفورد (Bradford, 1976) اندازه‌گیری گردید. برای الکتروفورز پروتئین‌های بذر از ژل متراکم‌کننده ٤ درصد و ژل جداکننده ۱۲/۵ درصد و برای رنگ‌آمیزی از کوماسی بلو استفاده شد. حضور باند با عدد یک و عدم حضور باند با عدد صفر مشخص گردید و تحلیل داده‌ها با استفاده از ماتریس صفر و یک در نرم‌افزارهای NTSYS 2.02e و GenAlEx انجام شد.

جدول ۱- گونه‌هایی از جنس فستوکا جمع‌آوری شده از مناطق مختلف

Table 1. Species of the genus Festuca collected from different sites

کد Code	گونه Specie	منطقه Region
G1	*F.ovina*	Gorgan-10502
G2	*F.ovina*	1049
G3	*F.ovina*	Khorram Abad-2213
G4	*F.ovina*	Kordestan-1779
G5	*F.ovina*	Hosein Abad-10501
G6	*F.ovina*	Mianeh-10042
G7	*F.ovina*	Gholestan-1596
G8	*F.ovina*	280-zanjan
G9	*F.ovina*	Karaj-10477
G10	*F.rubra*	U.S.A-1598
G11	*F.arundinacea*	Netherland-1610
G12	*F.arundinacea*	Ireland-DOVY
G13	*F.arundinacea*	FAO-1346
G14	*F.arundinacea*	Holland-1768
G15	*F.arundinacea*	4363
G16	*F.rubra*	U.S.A-1597
G17	*F.rubra*	Holland-1771
G18	*F.arundinacea*	4385
G19	*F.arundinacea*	Australia-1414
G20	*F.arundinacea*	4369
G21	*F.arundinacea*	4386
G22	*F.arundinacea*	Ireland-A2210

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-20]

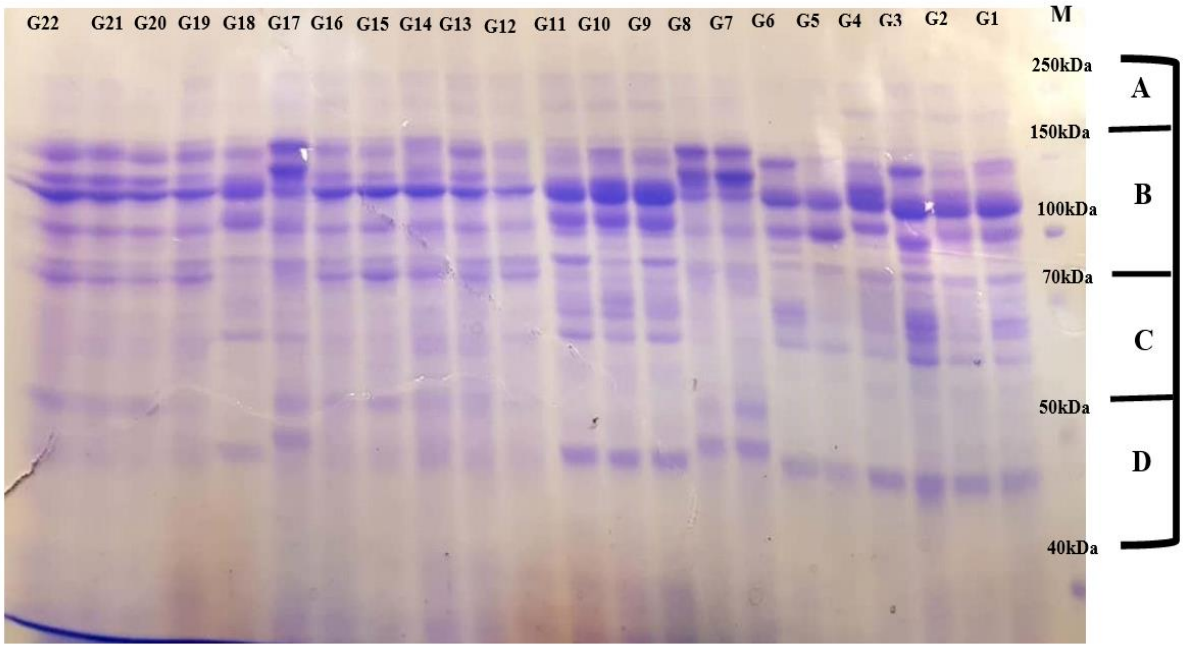
[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.2.3.9]

[DOI: 10.52547/pgr.8.2.4]

نتایج و بحث

تعداد ۲۲ باند پروتئینی با وزن مولکولی متفاوت از ۳۸ تا ۲٤٥ کیلودالتون در گونه‌های مورد مطالعه مشاهده گردید (جدول ۲ و شکل ۱). این گونه‌ها تنوع قابل‌توجهی در تعداد باندهای پروتئینی از ۱۳-۵ نشان دادند. بیشترین تعداد باند در G۱۷ (*F.rubra*) و کمترین تعداد باند پروتئینی در G۵ (*F.ovina*) مشخص شد. این تنوع قابل‌توجه در چهار منطقه (A-D) وجود داشت. منطقه A حاوی پروتئین‌هایی با وزن مولکولی بالا (kDa ۱۵۰- ۲۵۰) بود در حالی‌که در منطقه B تعداد ۸ باند پروتئین زیرواحد با اندازه (kDa ۱۵۰-۷۰) دیده شد. در منطقه C تعداد ٦ باند پروتئین با اندازه (kDa ۷۰-۵۰) مشاهده گردید اما در منطقه D فقط ۳ باند پروتئین با وزن مولکولی (kDa ۵۰-٤۰) وجود داشت. در منطقه A الگوی باندهای ۱، ۲ و ۳ در داخل گونه *F.rubra* یکسان بود. منطقه B الگوی باندهای ٦، ۱۰ و ۱۲ در گونه *F.rubra* و در منطقه C باندهای شماره ١٤، ۱۵ و ۱۷ در درون‌گونه *F.rubra* دارای الگوی یکسانی بودند اما الگوی باندها در درون‌گونه *F.arundinacea* و *F.ovina* متفاوت بود. باند شماره ١٤ کمیاب بوده و فقط در G۳ مشاهده شد، این باند می‌تواند به‌عنوان باند اختصاصی این ژنوتیپ برای شناسایی آن در نظر گرفته شود. حضور باند اختصاصی نشان دهنده وجود ژن‌های ویژه‌ای در گونه به‌دلیل تنوع گونه‌ای است (Nejadhabibvash *et al*., 2014).

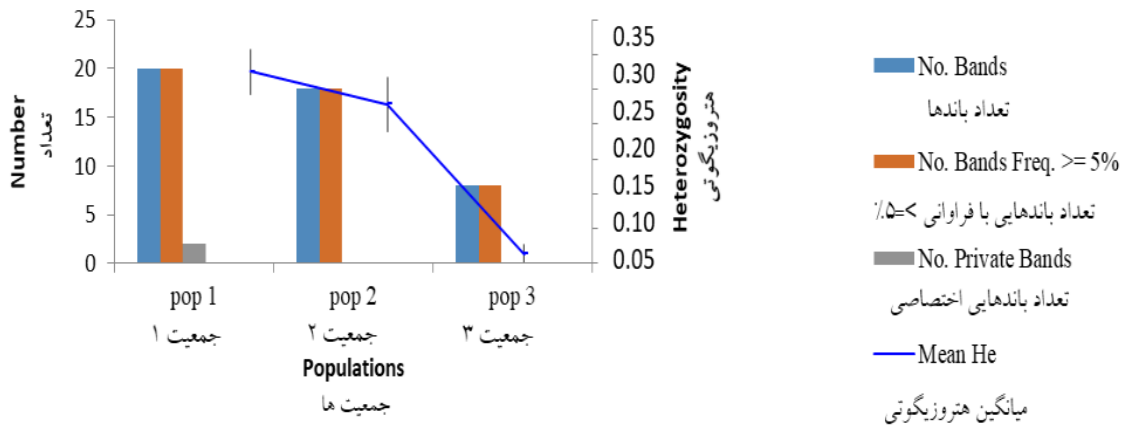
باند شماره ٤ در ژنوتیپ‌های G۳، G٤ و G۱۷ و همچنین باند شماره ۹ در ژنوتیپ‌های G٦، G۹، G۱۰ و G۱۸ دیده شد. اما باند شماره ۱۲ فقط در ژنوتیپ‌های G۳ و G٤ یافت شد و به‌علاوه باندهای شماره ۱۹ و ۲۰ در ژنوتیپ‌های G۷، G۸ و G۱۷ مشاهده گردید. باندهای شماره ۳، ٤، ٦، ۱۲، ١٤، ۱۹، ۲۰ و ۲۱ در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از گونه *F.arundinacea* دارای الگوی پروتئینی یکسانی بودند. باند شماره ۱۳ و ۲۱ در تمام ژنوتیپ‌های *F. arundinacea* به‌غیر از ژنوتیپ‌های G۱۱، G۱۸ دیده شد در حالی‌که باند شماره ۱۵ در گونه مذکور به استثناء ژنوتیپ G۱۱ مشاهده نشد.



شکل ۱- الگوی باندی الکتروفورز پروتئین بذر در سه گونه از جنس فستوکا

Figure 1. Seed protein banding electrophoresis pattern in three species of Festuca genus

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-20]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.2.3.9]
[DOI: 10.52547/pgr.8.2.4]



شکل۲– الگوی باندی در کل گونه‌ها

Figure 2. Banding pattern in all species

جدول ۲- تعداد، تحرک نسبی و وزن مولکولی، باندهای مشاهده شده

Table 2. Number, relative mobility and molecular weight of observed bands

باند Band	تحرک نسبی Relative migration distance	وزن مولکولی (کیلو دالتون) Molecular weight (kDa)
1	0.07	245.47
2	0.23	169.82
3	0.27	154.88
4	0.29	147.91
5	0.31	141.25
6	0.33	134.89
7	0.37	123.02
8	0.47	97.72
9	0.49	93.32
10	0.51	89.12
11	0.53	85.11
12	0.56	75.85
13	0.58	46.45
14	0.60	72.44
15	0.64	66.06
16	0.70	57.54
17	0.74	52.48
18	0.76	50.11
19	0.78	47.86
20	0.80	45.70
21	0.86	39.81
22	0.88	38.01

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-20]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.2.3.9]
[DOI: 10.52547/pgr.8.2.4]

باندهای شماره ۷ و ۸ در همه ژنوتیپ‌های گونه *F.rubra* به‌جز G۳ و G۸ مشاهده گردید. به‌طور مشابه باند شماره ۱۰ در همه ژنوتیپ‌های *F.rubra* به‌غیر از G٦ مشاهده شد. این درحالی است که باندهای شماره ١٦، ۱۸، ۱۹ و ۲۰ فقط در ژنوتیپ‌های G۷ و G۸ از گونه *F.rubra* دیده شد. باندهای مشاهده شده همه پلی‌مورفیک بودند اما باند شماره ۱۰ با وزن مولکولی ۸۹/۱۲ کیلودالتون تنها باندی است که در منطقه B قرار دارد و در همه گونه‌ها بجز G٦ (*F.ovina*) و G۱۸ (*F.arundinacea*) مشترک بود. وجود الگوی باندی متفاوت نشان می‌دهد که تنوع ژنتیکی وجود دارد، اما حضور باند مشترک بین‌گونه‌ها نشان دهنده قرابت ژنتیکی است (Sinha *et al*., 2012).

وجود باند مشترک در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در تحقیق حاضر می‌تواند نشان دهنده منشاء تکاملی مشابه برای آن‌ها باشد همان‌گونه که عزیز و همکاران (Azeez *et al*., 2013) گزارش نمودند حضور باندهای مشترک در گونه‌های *Lycopersicon* و *Trichosanthes* منشاء تکاملی مشابهی برای آن‌ها نشان می‌دهد. تفاوتی که در تراکم بعضی از باندهای پروتئینی دیده شد مشخص می‌نماید که تعدادی از پپتیدهای پروتئینی در وزن مولکولی خاصی روی هم قرار گرفته‌اند. همچنین الگوی پروتئینی خاصی را نمی‌توان به هر یک از گونه‌ها اختصاص داد. از آن‌جایی‌که پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر محصول مستقیم ژن‌ها هستند می‌توانند انعکاس‌دهنده تنوع ژنومی باشند (Crawford, 1990). چندین مطالعه نشان داده‌اند که در سلول گیاهی به‌منظور سازش‌پذیری گیاه با تغییرات محیطی، تغییر در گروه‌های پروتئینی مهم است. این تغییرات ممکن است به‌دلیل عوامل درونی گیاه نظیر تنظیم‌کننده‌های رشد یا مواد شیمیایی حاصل از فعالیت‌های متابولیکی باشد که بر فعالیت ژن‌ها تأثیر می‌گذارد (Salisbury and Ross, 1991).

از طرف دیگر تغییر در الگوی پروتئین ذخیره‌ای بذر نشان دهنده تغییراتی است که در طول تنوع گونه‌ای رخ داده است. حضور یا عدم حضور باندهای پروتئینی در ژل الکتروفورز می‌تواند به‌عنوان نشانگر رده‌بندی استفاده شود (Yousofi *et al*., 2013). نتایج تجزیه AMOVA نشان داد که درصد تنوع بین‌گونه‌ها ۲۳ درصد و درون گونه‌ها ۷۷ درصد است. با توجه به نتایج تجزیه AMOVA سطح بالایی از تنوع ژنتیکی درون گونه‌ها تا بین گونه‌ها نشان داده شد که می‌تواند ناشی از ماهیت دگرگشنی در این جنس باشد (جدول ۳). درصد پلی‌مورفیسم گونه *F.ovina*، *F.arundinacea* و *F.rubra* به‌ترتیب ۸۳/۳٦، ۷۲/۷۳ و ٤/٥٥ درصد بود. به‌علاوه این مطالعه سطح هتروزیگوتی در گونه‌های *F.ovina*، *F.arundinacea* و *F.rubra* را به‌ترتیب ۰/۲۷، ۰/۲۳ و ۰/۰۱ مشخص کرد، همچنین تعداد آلل مؤثر (Ne) و شاخص اطلاعات شانون (I) در گونه‌های *F.ovina*، *F.arundinacea*. و *F.rubra* به‌ترتیب ۱/٤۳، ۱/۳۷ و ۱/۰۱ بود (جدول ٤).

جدول ۳- تجزیه AMOVA بین و درون گونه‌های فستوکا مورد مطالعه با استفاده از الگوی SDS-PAGE

Table 3. Analysis of molecular variance (AMOVA) between and within the studied species of Festuca using SDS-PAGE pattern

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	مجموع مربعات SS	میانگین مربعات MS	واریانس تخمین‌زده Estimated variance	درصد واریانس Percentage of variance
بین جمعیت Among populations	2	19.146	9.573	0.961	23
درون جمعیت Within populations	19	59.944	3.155	3.155	77
کل Total	21	79.091		4.116	100

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-20]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.2.3.9]
[DOI: 10.52547/pgr.8.2.4]

جدول ٤- شاخص‌های تنوع ژنتیکی در گونه‌های فستوکا مورد مطالعه

Table 4. Genetic diversity indices in the Festuca species

جمعیت Population	N	Na	Ne	I	He	uHe	Polymorphism loci%	No. of bands	No.bands freq (≥ 5%)	No private bands
F.ovina	9	1.77	1.436	0.426	0.275	0.292	83.36	20	20	2
F.arundinacea	10	1.545	1.373	0.35	0.229	0.241	72.73	18	18	0
F.rubra	3	0.409	1.019	0.022	0.014	0.016	4.55	8	8	0

Na: تعداد آلل متفاوت؛ Ne: تعداد آلل موثر؛ He: هتروزیگوتی مورد انتظار؛ uHe: شاخص هتروزیگوتی مورد انتظار تصحیح‌شده؛ Polymorphism loci%: درصد مکان پلی‌مورفیسم؛ No bands: تعداد باندهای متفاوت؛ No bands freq: تعداد باندهایی با فراوانی بیشتر از۵ درصد؛ No private bands: تعداد باندهای اختصاصی؛ I: شاخص شانون

Na: No. of different alleles; Ne: No. of effective alleles; He: Expected heterozygosity; uHe: Unbiased expected heterozygosity; No bands: No. of different bands; No bands freq: No. of different bands with a frequency >= 5%; No private bands: N0 of bands unique to a single population; I: Shannon's information index

گونه‌های *F.ovina* و *F.rubra* به‌ترتیب بیشترین درصد و کمترین مقدار پلی‌مورفیسم را به خود اختصاص دادند. با توجه به اختلاف معنی‌دار شاخص‌های محاسبه شده در بین سه گونه مورد مطالعه مشخص شد که سه گونه مذکور دارای ساختار ژنتیکی متفاوتی هستند. تنوع مشاهده شده در الگوی پروتئینی بذر گونه‌های فستوکا می‌تواند به‌علت هتروزیگوتی ناشی از دگرگشنی، تفاوت گونه‌ها یا جمع‌آوری ژنوتیپ‌ها از مناطق متفاوت باشد. در مطالعه ارزیابی ژنوتیپ‌هایی از *Festuca pratensis* مشخص شد که این ژنوتیپ‌ها بر اساس پلی‌مورفیسمی که در الگوی پروتئینی مشاهده شد به‌طور موثری می‌توانند از هم متمایز شوند. بنابراین SDS-PAGE می‌تواند به‌عنوان روشی سریع و قابل اعتماد برای شناسایی ژنوتیپ‌های این گونه در برنامه‌های اصلاحی و صنعت بذر استفاده شود (Stoyanova and Boller, 2010) که تأییدکننده نتایج تحقیق حاضر است.

ضریب تشابه بر اساس حضور و عدم‌حضور باند محاسبه شد و دامنه ضریب تغییرات از ۰/۹ – ۰/۰٦ بود (جدول ۵). بالاترین ضریب تشابه بین G۱۲ و G۱۹ که هر دو از گونه *F.rubra*، G۲۰ و G۲۱ هر دو از گونه *F.arundinacea* بودند مشاهده گردید. این مطلب حاکی از آن است که از نظر پلی‌ژنتیکی این ژنوتیپ‌ها نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها مرتبط‌تر هستند و کمترین ضریب تشابه بین G۱٤ و G۱۵ (*F.arundinacea*) با G٦ (*F.ovina*) وجود دارد، بنابراین نتیجه گرفته می‌شود آن‌ها از روند متفاوت‌تری تکامل یافته‌اند و همچنین توصیه می‌شود برای به‌دست آورن ارقام ترکیبی از آن‌ها به‌عنوان والدین در تلاقی استفاده شود. با توجه به مطالعه (Afkar *et al*., 2010) و با در نظر گرفتن ضریب تشابه بالا (۱) بین G۱۲ و G۱۹ از گونه *F.rubra* و G۲۰ و G۲۱ ازگونه *F.arundinacea*، می‌توان گفت ژنوتیپ‌های ذکر شده در واقع یک ژنوتیپ تحت نام‌های مختلف در مکان‌های متفاوت هستند. همچنین احتمالاً قرار گرفتن ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در بیش از یک گروه نشان دهنده این است که شاید تکامل *Festuca* بیش از یک مسیر داشته باشد. اطلاعات کافی در مورد ضریب تشابه ژنتیکی در مورد ژنوتیپ‌های مختلف گیاهان اهمیت زیادی در اصلاح گیاهان دارد. از اطلاعات ضرایب تشابه می‌توان برای شناسایی گروه‌های متفاوت و انتخاب والدین در دورگ‌گیری و تولید هیبرید استفاده کرد (Bonato *et al*., 2006). با تلاقی بین جمعیت‌هایی با فاصله ژنتیکی بالا انتظار می‌رود که هتروزیس بیشتری به‌دست آید (Peters and Martinelli, 1989). نتایج تجزیه خوشه‌ای بر اساس الگوی پروتئین ذخیره‌ای بذر در ژنوتیپ‌های ارزیابی‌شده با استفاده از ماتریس فاصله اقلیدسی و روش UPGMA چهارگروه متفاوت نشان داد. ژنوتیپ‌های G۱، G۲، G٤، G۵ و G۳ در گروه یک و گروه دو شامل پنج ژنوتیپ G٦، G۹، G۱۰، G۱۱ و G۱۸، گروه چهار شامل سه ژنوتیپ G۷، G۸ و G۱۷ و نه ژنوتیپ باقی‌مانده در گروه سه قرار گرفتند (شکل ۳). گروه یک همه از گونه *F.ovina* بودند اما گروه دو شامل دو جمعیت از گونه *F.ovina*، دو جمعیت از

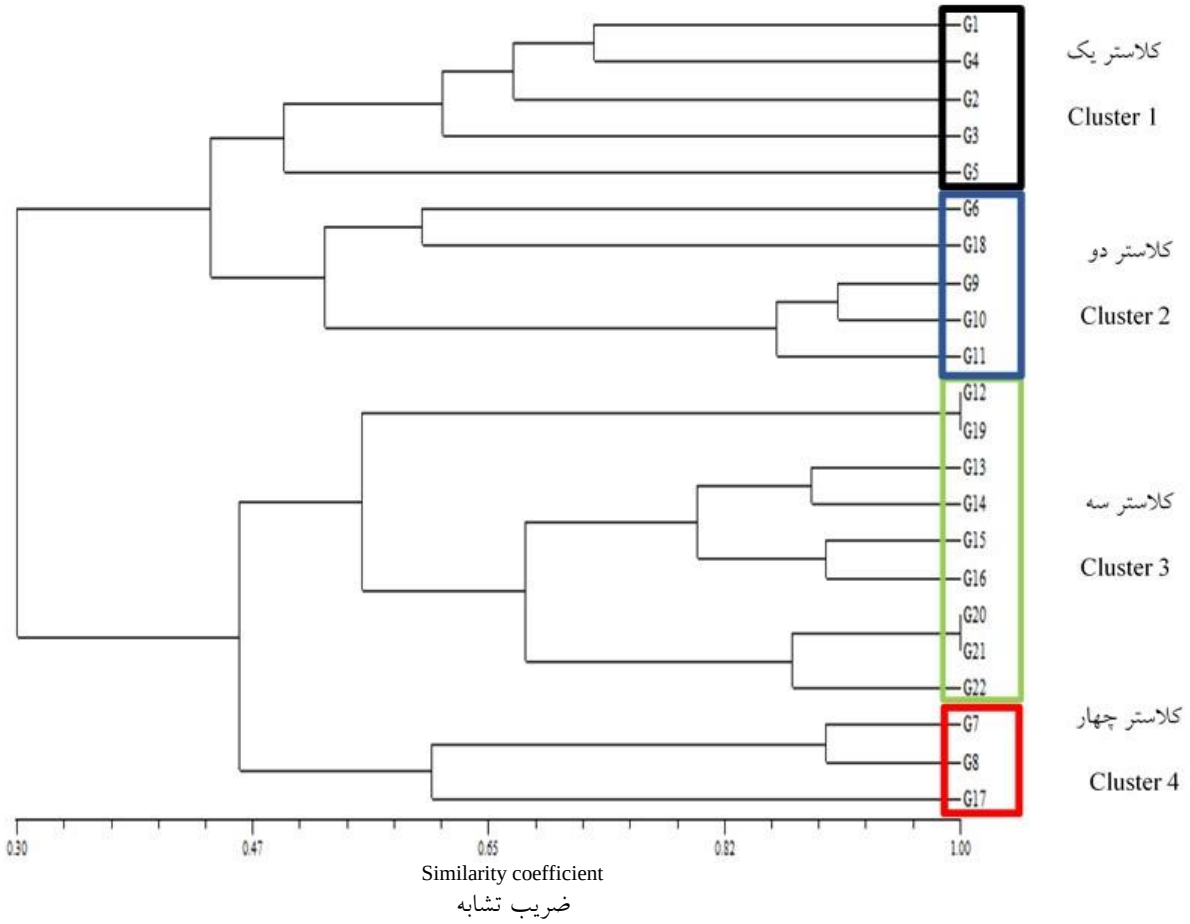
[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-20]

[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.2.3.9]

[DOI: 10.52547/pgr.8.2.4]

گونه *F.arundinacea* و یک جمعیت از گونه *F.rubra* بود. گروه سه همه جمعیت‌ها از گونه *F.arundinacea* بودند به‌جز یکی که از گونه *F.rubra* بود. در گروه چهار، دو جمعیت از گونه *F.ovina* و یک جمعیت از گونه *F.rubra* مشاهده شد. نتایج تجزیه خوشه‌ای با نتایج تجزیه AMOVA هم‌خوانی داشت که در این بررسی تنوع درون گونه‌ای بیشتر از تنوع بین گونه‌ای بود. گروه چهار کوچکترین گروه و گروه سه با حداکثر تعداد ژنوتیپ بزرگترین گروه را تشکیل دادند. با توجه به دندروگرام، مشاهده گردید که ژنوتیپ G١٤ و G١٥ (گونه *F.arundinacea*) از ژنوتیپ G٦ (گونه *F.ovina*) بیشترین فاصله را دارد که می‌تواند در برنامه‌های اصلاحی برای به‌دست آوردن واریته‌هایی با بالاترین سطح از تغییرپذیری ژنتیکی مورد توجه قرار گیرد.

مطالعه حاضر می‌تواند برای ساختن بانک ژن با ژنوتیپ‌های متنوع در ایران استفاده شود. به‌طورکلی با استفاده از روش الکتروفورز پروتئین بذر تنوع قابل‌توجهی درون گونه‌های فستوکا قابل مشاهده بود، اما تمایز گونه‌ها به‌سختی امکان‌پذیر بود. از یافته‌های مطالعه حاضر می‌توان در کارآمد نمودن برنامه‌های به‌نژادی این جنس استفاده نمود. در پایان پیشنهاد می‌شود به منظور دستیابی به اطلاعات کامل‌تر و بررسی تنوع بین‌گونه‌ای در کنار این روش از نشانگرهای مولکولی مناسب جهت بررسی گونه‌های مورد مطالعه استفاده گردد.



شکل ۳- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ۲۲ جمعیت از سه گونه فستوکا (*F.arundinacea, F.rubra* و *F.ovina*) به روش UPGMA

Figure 3. Cluster analysis by UPGMA method for 22 populations of three species of Festuca (*F.arundinacea*, *F.rubra* and *F.ovina*) by UPGMA method

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-20]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.2.3.9]
[DOI: 10.52547/pgr.8.2.4]

جدول ۵- بررسی ضریب شباهت جاکارد بین ژنوتیپ‌های فستوکا

Table 5. Jaccard similarity coefficients between genotypes of Festuca

کد ژنوتیپ Genotype code	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	G13	G14	G15	G16	G17	G18	G19	G20	G21	G22
G1	1																					
G2	0.63	1																				
G3	0.69	0.53	1																			
G4	0.72	0.7	0.61	1																		
G5	0.50	0.62	0.31	0.55	1																	
G6	0.50	0.33	0.42	0.41	0.44	1																
G7	0.25	0.28	0.15	0.26	0.36	0.2	1															
G8	0.18	0.21	0.1	0.2	0.27	0.13	0.9	1														
G9	0.50	0.58	0.53	0.42	0.45	0.58	0.31	0.25	1													
G10	0.42	0.5	0.46	0.35	0.36	0.5	0.25	0.26	0.9	1												
G11	0.53	0.63	0.57	0.46	0.5	0.5	0.33	0.26	0.9	0.18	1											
G12	0.41	0.66	0.46	0.45	0.33	0.15	0.3	0.23	0.5	0.41	0.54	1										
G13	0.35	0.54	0.4	0.38	0.27	0.13	0.46	0.38	0.42	0.35	0.46	0.77	1									
G14	0.28	0.45	0.33	0.3	0.18	0.06	0.38	0.41	0.35	0.38	0.38	0.66	0.88	1								
G15	0.26	0.41	0.31	0.28	0.16	0.06	0.46	0.5	0.33	0.35	0.35	0.6	0.8	0.88	1							
G16	0.33	0.38	0.37	0.26	0.15	0.12	0.42	0.46	0.4	0.42	0.42	0.54	0.72	0.8	0.9	1						
G17	0.35	0.31	0.38	0.29	0.2	0.23	0.64	0.57	0.41	0.35	0.43	0.42	0.57	0.5	0.57	0.64	1					
G18	0.28	0.33	0.25	0.3	0.44	0.6	0.38	0.3	0.58	0.5	0.5	0.25	0.3	0.23	0.21	0.2	0.23	1				
G19	0.41	0.66	0.46	0.45	0.33	0.15	0.3	0.23	0.5	0.41	0.54	1	0.77	0.66	0.6	0.54	0.42	0.25	1			
G20	0.21	0.25	0.18	0.23	0.2	0.07	0.54	0.6	0.2	0.21	0.21	0.4	0.6	0.66	0.77	0.7	0.42	0.25	0.4	1		
G21	0.21	0.25	0.18	0.23	0.2	0.07	0.54	0.6	0.2	0.21	0.4	0.6	0.66	0.77	0.77	0.7	0.42	0.25	0.4	1	1	
G22	0.28	0.33	0.25	0.3	0.3	0.14	0.63	0.54	0.26	0.2	0.28	0.5	0.7	0.6	0.7	0.63	0.5	0.33	0.5	0.87	0.87	1

با توجه به نتایج این تحقیق مشخص شد که درصد تنوع درون گونه‌های مورد مطالعه بیشتر از بین سه گونه فستوکاست. کمترین ضریب تشابه بین دو ژنوتیپ از *F.arundinacea* با یک ژنوتیپ از *F.ovina* وجود داشت که استفاده از این دو گونه به‌عنوان برای تولید ارقام ترکیبی پیشنهاد می‌شود. نتایج حاصل از این پژوهش به طبقه‌بندی، حفاظت و شناسایی منابع ژنتیکی فستوکا کمک می‌کند و می‌تواند در برنامه‌های به‌نژادی این محصول مؤثر باشد.

References

Afkar, S., Karimzadeh, Gh. and Jafari, A.A. (2010). Genetic variation in Tall Fescue (*Festuca arundinacea*) populations based on seed storage protein polymorphism. *Journal of New Seeds*, **11:** 390-398.

Azeez, M.A., Aremu, C.O. and Olaniyan, O.O. (2013). Assessment of genetic variation in accessions of Sesame (*Sesamum indicum*) and its crosses by seed protein electrophoresis. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, **19(4):** 383-391.

Bonato, A.V., CalvoII, E.S., Geraldi, I.O. and Arias, A.A. (2006). Genetic similarity among soybean (*Glycine max* L.) cultivars released in Brazil using AFLP markers. *Genetics and Molecular Biology*, **29:** 692-704.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytic Biochemistry*, **72(1–2):** 248-254.

Bughrara, S.S., Sleper, D.A. and Krause, G.F. (1991). Genetics variation in tall fescue digestibility estimated using a prepared cellulose solution. *Crop Science*, **31:** 883-889.

Cheng, Y., Zhou, K., Humphreys, M.W., Harper, J.A., Ma, X., Zhang, X.,Yan, H. and Huang, L. (2016). Phylogenetic relationships in the Festuca-Lolium complex (*Loliinae;*

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-20]

[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.2.3.9]

[DOI: 10.52547/pgr.8.2.4]

Poaceae): new insights from chloroplast sequences. *Frontiers in Ecology and Evolution*, **4:** 1-12.

Crawford, D.J. (1990). *Plant Molecular Systematics*. John Wiley and Sons, New York, USA.

Fu, K., Zhihui, G., Xinquan, Z., Yan, F., Wendan, W., Daxu, L., Yan, P., Linkai, H., Ming, S., Shiqie, B. and Xiao, M. (2016). Insight into the genetic variability analysis and cultivar identification of tall fescue by using SSR markers. *Hereditas*, **153:** 9-20.

Gaut, B.S., Tredway, L.P., Kubik, C., Gaut, R.L. and Meyer, W. (2000). Phylogenetic relationships and genetics diversity among members of the Festuca-Lollium complex (Poacea) based on ITS sequence data. *Plant Systematics and Evolution*, **224:** 33-53.

Gepts, P. (1989). Genetic Diversity of Seed Storage Proteins in Plants. In: Brown, A.H.D., Clegg, M.T., Kahler, A.L. and Weir, B.S., Eds., *Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources*. pp. 215–241. Sinauer Associates Inc. Sunderland, Massachusett, USA.

Gholami Farahabadi, M., Ranjbar, G.A., Dehestani-Kalagar, A. and Bagheri, N. (2021). Investigation of qualitative traits and genes expression involved in bakery quality for some of the bread's wheat doubled haploid lines. *Plant Genetic Researches*, **8(1):** 151-168 (In Persian).

Gilliland, T.J., Coll, R., Calsyn, E., De Loose, M., van Eijk, M.J.T. and Roldán-Ruiz, I. (2000). Estimating genetic conformity between related ryegrass (Lolium) varieties, morphology and biochemical characterization. *Molecular Breeding*, **6:** 569-580.

Guy, C.L., Haskell, D., Neven, L., Kelin, P. and Smelser, C. (1992). Hydration state responsive proteins link and drought stress in spinach. *Planta*, **88:** 265-270.

Inda, L.A., Segarra-Moragues, J.G., Müller, J., Peterson, P.M. and Catalán, P. (2008). Dated historical biogeography of the temperate Loliinae (Poaceae, Pooideae) grasses in the northern and southern hemispheres. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **46:** 932-957.

Iqbal, S.H., Ghafoor, A. and Ayub, N. (2005). Relationship between SDS-PAGE markers and Ascochyta blight in chickpea. *Pakistan Journal of Botany*, **37:** 87-96.

Kakaei, M. and Kahrizi, D. (2011). Study of seed proteins pattern of *Brassica napus* varieties via sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *International Research Journal of Biotechnology*, **2:** 26-28.

Kancherla L.S. and Bhalla, P.M. (2003). Phenotypic variations in micropropagated Australian ornamental climber *Pandorea* pandorana. *Acta Horticulture*, **616:** 463-466.

Kauppinen, M., Saikkonen, K., Helander, M., Pirttilä, A.M. and Wäli, P.R. (2016). Epichloë grass endophytes in sustainable agriculture. *Nature Plants*, **2:** 1-7.

Loureiro, J., Kopecký, D., Castro, S., Santos, C. and Silveira, P. (2007). Flow cytometric and cytogenetic analyses of Iberian Peninsula *Festuca* spp. *Plant Systematics and Evolution*, **269:** 89-105.

Mahmoud, A.A., Natarajan, S.S., Bennett, J.O., Mawhinney, T.P., Wiebold, W.J. and Krishnan, H.B. (2006). Effect of six decades of selective breeding on soybean protein composition and quality: A biochemical and molecular analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54:** 3916-3922.

Masoumi, P., Amini, F. and Ramshini, H. (2020). Genetic variation of seed related traits in Festuca arundinacea using multivariate statistical methods. *Plant Genetic Researches*, **6(2):** 55-68 (In Persian).

Mirzaei Nadoushan, H., Shariat, A. and Asadi Corom, F. (2002). Evaluation of existing genetic variation in different populations of *Haloxylon* Spp. Using electrophoresis technique. *Iranina Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, **7(1):** 99-117 (In Persian).

Movahed, B., Jafari, A.A. and Moradi, P. (2013). Investigation on variation and relationships among seed yield and its components in sheep fscue (*Festuca ovina*) under irrigation and dryland farming conditions, Zanjan, *Iran. Iranian Journal of Range and Desert Research*, **20(2):** 309-319 (In Persian).

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-20]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.2.3.9]
[DOI: 10.52547/pgr.8.2.4]

Nejadhabibvash, F., Hasanzadeh Gorttapeh, A. and Tofigh, S. (2014). Genetic variation of some Iranian Hyoscyamus landraces based on seed storage protein. *Etho-Pharmaceutical Products*, **1(2):** 14-22.

Parashar, N., Jakhar, L.K., Krishna, R. and Jangid, K. (2015). Genetic diversity for storage seed protein profile in mustard (*Brassica Juncea*) genotypes. *An International Quarterly Journal of Environmental Sciences*, **8:** 177-182.

Peters, P.J. and Martinelli, A.J. (1989). Hierarchical cluster analysis as a tool manages variation in germplasm collections. *Theoretical and Applied Genetics*, **78:** 42-48.

Rahman, M.M. and Hirata, Y. (2004). Genetic diversity in *Brassica* species using SDS-PAGE analysis. *Journal of Biological Sciences*, **4:** 234-238.

Reed, K.F.M., Clement, S.L., Feely, W.F. and Clark, B. (2004). Improving tall fescue (*Festuca arundinacea*) for cool-season vigour. *Australian Journal of Experiental Agric*ulture, **44:** 873-881.

Salehi Shanjani, P., Jafari, A.A. and Jahanbaz, R. (2015). Investigation of genetic variations among crested Wheatgrass species based of agronoical traits and total leafprotein. *Journal of Rangeland Science*, **5(3):** 165-180 (In Persian).

Salisbury, F.B. and Ross, C.W. (1991). *Plant Physiology*. Wadsworth Publishing Company, Baverly Belmont, California, USA.

Sharma, D.B. and Krishna, K.R. (2017). Genetic diversity in cowpea (*Vigna unguiculata*) accessions using protein profiling. *International Journal of Pure and Applied Biosciences*, **5(2):** 491-496.

Sinha, K.N., Singh, M. and Kumar, C. (2012). Electrophoretic study of seed storage protein in five species of Bauhinia. *Journal of Pharmceutical and Biological Sciences*, **4(2):** 8-11.

Soreng, R.J., Peterson, P.M., Romaschenko, K., Davidse, G., Zuloaga, F.O., Judziewicz, E.J., Filgueiras, T.S., Davis, J.I. and Morrone, O. (2015). A worldwide phylogenetic classification of the Poaceae (Gramineae). *Journal of Systematics and Evolution*, **53:** 117-137.

Stoyanova, S. and Boller, B. (2010). Seed protein electrophoresis for assessment of genetic variation within genotype of Meadow Fescue (*Festuca pratensis*). *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, **46:** 576-581.

Tzveler, N.N. (1989). The system of grasses (Poaceae) and their evolution. *Botanical Review*, **55:** 141-204.

Wang, Z., Hopkins, A. and Main, R. (2001) Forage and turfgrass biotechnology. *Critical Reviews in Plant Science*, **20:** 573-619.

Weibull, P., Ghatnekar, L. and Bengtsson, O. (1991). Genetic variation in commercial varieties and natural populations of sheep Fescue(*Festuca ovina*). *Plant Breeding*, **107:** 203-209.

Yousofi, M., Esmaeili, M. and Otroshy, M. (2013). Genetic variation natural populations of *Agropyron cristaum* based on SDS-PAGE of seed proteins. *The Iranianian Journal of Botany*, **19(2):** 186-193 (In Persian).

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-20]

[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.2.3.9]

[DOI: 10.52547/pgr.8.2.4]

Investigation of Intera- and Interspecies Variation of Festuca Using Seed Protein Electrophoresis

Soheila Afkar[1,*], Faranak Hadi [2] and Aliashraf Jafari[3]

1- Assistant Professor, Agriculture Department, Payame Noor University, Tehran, Iran
2- Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Lorestan University, Khorramabad, Iran
3- Professor, Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

(Received: September 27, 2021 – Accepted: December 15, 2021)

Abstract

Festuca is one of the largest genera of the grass family, which has more than 600 species with different ploidy levels. The aim of this study was to estimate the genetic diversity within 22 populations of three species of Festuca (*Festuca arundinacea*, *F.rubra* and *F.ovina*) using a seed storage protein electrophoresis pattern. These species showed a significant variation in the number of protein bands from 5-13. The highest number of bands was found in G17 (*F.rubra*) and the lowest number of protein bands was in G5 (*F.ovina*). Band number 14 was only observed in G3. It is suggested that this band can be considered as a specific band for the identification of this genotype. According to the results of AMOVA analysis, there is a high level of genetic diversity within the species rather than between species that can be due to the out-crossing nature of this genus. According to observed differences for variation parameters among the three studied species, it is concluded that they have dissimilar genetic structures. The results of cluster analysis based on seed storage protein profiles in evaluated genotypes using Euclidean distance matrix and UPGMA method showed four groups. The lowest similarity coefficient was between G14 and G15 (*F.arundinacea*) with G6 (*F.ovina*). Hence, it is suggested that they evolved from a different evolutionary process and it is suggested to use them as the parents of new synthetic varieties. The observed diversity in the seed protein pattern in the three species of Festuca, can be explained by allogamy-induced-heterozygosity, species difference or population collection from various regions.

Keywords: Cluster analysis, Festuca species, Genetic variation, Protein marker, SDS-PAGE

*** Corresponding Author, E-mail: s.afkar@pnu.ac.ir**

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2024-05-20]

[DOR: 20.1001.1.23831367.1400.8.2.3.9]

[DOI: 10.52547/pgr.8.2.4]