

بررسی تنوع پروتئینی و میزان بیان پپتیدهای متفاوت در اکوتیپ‌های گیاه ناخنک (*Astragalus hamosus* L.) با استفاده از روش SDS-PAGE

حسین زینلی^۱، مهدی هادی پور^۲، آذر آرتی^۳، مریم صادقی^۴ و معصومه حسن بارانی^۵

*۱- نویسنده مسئول مکاتبات، دانشیار، بخش تحقیقات منابع طبیعی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اصفهان، پست الکترونیک: hoszeinali@yahoo.com

۲- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی، دانشگاه صنعتی اصفهان

۳- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی، دانشگاه پیام نور

۴- کارشناس ارشد سیستماتیک اکولوژی، دانشگاه اصفهان

۵- دانش آموخته دکترای سیستماتیک گیاهی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۲/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۶/۱۸

چکیده

ناخنک (*Astragalus hamosus*) گیاهی یکساله، علفی متعلق به خانواده بقولات می‌باشد. شناخت الگوی تنوع گونه‌ها امری مهم در برنامه‌های به‌نژادی بوده و منجر به آگاهی از فرایندهای تکاملی می‌شود. این مطالعه به منظور بررسی تنوع پروتئینی اکوتیپ‌های این گیاه انجام شد. با توجه به آنالیز تنوع پروتئینی گیاه *A. hamosus*، محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) در این مطالعه برابر ۰/۴۹ محاسبه شد. نمودار خوشه‌ای با ضریب تشابه دایس و به‌روش UPGMA ترسیم شد. اکوتیپ‌های مورد مطالعه با استفاده از خط شاخص، در ضریب تشابه ۸۸ درصد در سه زیرگروه قرار گرفتند. از ۱۳ اکوتیپ مورد مطالعه، ۱۱ مورد با تشابه نسبتاً بالایی در یک گروه قرار گرفتند. اکوتیپ ۱ کرمانشاه با تفاوت معنی‌داری از سایر اکوتیپ‌ها تفکیک شد. با توجه به نتایج حاصل از میزان بیان ۷ پپتید بررسی شده در ۱۳ اکوتیپ مورد مطالعه، از لحاظ تجمعی بیشترین و کمترین بیان پپتیدی، به ترتیب مربوط به پپتید ۶ با ۲۴۱۹۵ واحد و ۷ با ۴۳۲۸ واحد نرم‌افزار PhoretixPro مشاهده گردید. بر اساس آنالیز نمودارها، در کل پپتیدهای بیان شده در اکوتیپ‌های مختلف، بیشترین بیان مربوط به پپتید ۴ از اکوتیپ ۲ کرمانشاه بود. پپتید ۷ در هیچ‌یک از اکوتیپ‌های مورد بررسی دیگر حتی به میزان بسیار اندک نیز بیان نشده بود. در واقع با ظهور این پپتید، پروتئین جدیدی به پروفایل پروتئینی گیاه *A. hamosus* موجود در اکوتیپ کرمانشاه اضافه گردید.

واژه‌های کلیدی: بیان پروتئین، تنوع پروتئینی، *A. hamosus* PhoretixPro

مقدمه

از مراکز مهم تنوع گونه‌های این جنس می‌باشد (Masumi, 2003)، مطالعات پروتئینی و ژنتیکی در این گیاهان کاملاً ضروری به نظر می‌رسد. گونه ناخنک (*Astragalus*

Astragalus spp). یکی از بزرگترین جنس‌های گیاهی ایران بوده و از آنجا که ایران خاستگاه اصلی و یکی

و آلوانزیم‌ها اشاره کرد. این پروتئین‌ها از طریق الکتروفورز و رنگ‌آمیزی، قابل جداسازی و تشخیص می‌باشند. از مزایای نشانگرهای بیوشیمیایی می‌توان به تظاهر پایدار آنها در شرایط محیطی مختلف، توارث هم‌باز، مطالعه تعداد زیادی ژن به‌طور هم‌زمان، تعیین دقیق ژنوتیپ‌ها و انتخاب ژنوتیپ‌های مطلوب اشاره نمود (Chavla, 2003). ارزیابی جوانه‌زنی و شکست خواب بذر گیاه *A. hamosus* توسط Patane و Gresta (2006) و مطالعه تنوع مورفولوژیکی این گیاه توسط Zoghiami و Zouaghi (2003) انجام شده است. همچنین تنوع ایزوزایمی دو گونه گون *A. persicus* و *A. gossypinus* توسط Zarre و همکاران (2007) بررسی شده است. Allpin و همکاران (۲۰۰۵) به ارزیابی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های گون *A. cremnophylax* و *A. humillimus* بر اساس تفاوت‌های مورفولوژیکی، ژنتیکی، تولیدمثلی و اکولوژیکی پرداختند. در مطالعه آنان داده‌های آلوزایمی از ۱۸ لوکوس، تنوع درون جمعیتی پایینی را نشان دادند و بیشتر تغییرات در بین جمعیت‌ها مشاهده شد. در بررسی Rahim Malek و همکاران (۱۳۹۰) بر روی تنوع ژنتیکی ۱۶ جمعیت گون زرد و سفید (*Astragalus gossypinus* and *As. parrowianus*) از سه منطقه حفاظت شده استان اصفهان (موته، کلاه قاضی و قامیشلو) با استفاده از نشانگر ISSR، مشخص شد که گون‌های سفید در کل در سه منطقه مورد مطالعه از نظر ژنتیکی به یکدیگر نزدیک‌ترند، اما گون‌های زرد متنوع‌تر می‌باشند. Walker و Metcalf (۲۰۰۸) در بررسی تنوع ژنتیکی *A. jaegerianus* با نشانگر AFLP نشان داد که سطح تنوع ژنی درون جمعیت‌ها همبستگی معنی‌داری با تراکم جمعیت داشت، در حالی‌که فواصل جغرافیایی و جریان ژنی، الگوهایی از ساختار جمعیت را نشان دادند. شناخت الگوی تنوع پروتئینی گونه‌ها و زیرگونه‌ها می‌تواند گامی مهم در جلوگیری از رانده شدن ژنتیکی و اصلاح و به‌نژادی آنها باشد. در این میان، شناخت تنوع پروتئینی گیاهان دارویی و صنعتی به دلیل خواص ارزشمند آنها بسیار پراهمیت می‌باشد و با توجه به اینکه تاکنون مطالعات مولکولی بر روی گونه *A. hamosus* در

(*L. hamosus*) دارای ارزش دارویی، صنعتی و علوفه‌ای می‌باشد و دامنه وسیع آن در جهان شامل اروپا، ترکیه، ایران، قفقاز، اکراین، آسیای مرکزی، افغانستان، پاکستان، عراق، سوریه، اردن، لبنان، فلسطین، شبه‌جزیره عربستان و شمال آفریقا می‌باشد و در ایران در شمال، شمال‌شرق، غرب، جنوب‌غربی و مرکز کشور پراکنده است. زمان گلدهی آن اواخر بهار تا اوایل تابستان بوده و متعلق به مناطق ایرانی-تورانی و خلیج عمانی است. دارای میوه نیام به درازی ۲۰ تا ۴۰ سانتی‌متر، استوانه‌ای شکل، نازک، خمیده و به‌رنگ خاکستری مایل به قهوه‌ایست (Masumi, 2003). تحقیقات کمی در مورد گونه *A. hamosus* انجام شده و نیای ژنتیکی آن مشخص نیست (Luo et al., 2000). مواد مؤثره در *A. hamosus* شامل اسیدهای چرب ضروری، اسانس، هیدروکربن‌ها، الکل، استر، ترین، آلدئید و کتون می‌باشد، همچنین دارای اثرهای ضد التهاب، ضد درد، ضد لخته‌شدن خون، ضد میگرن و ضد تشنج می‌باشد (Krsteva-Platikanov et al., 2007). این گیاه حاوی یک نوع صمغ شبیه کتیرا و ساپونین است. گیاه *A. hamosus* به‌عنوان تقویت‌کننده، ضد درد و ضدنفخ توسط عطاری‌ها عرضه می‌گردد (Soltani, 2004). قسمت خوراکی و مورد استفاده این گیاه میوه و سرشاخه‌های گلدار آن است که دارای چند عامل مؤثر دارویی از جمله اسید ملیونیک، ویتامین C، گلیکوزید، فلاونوئید، تانن، مواد رنگی، اسانس معطر و کومارین می‌باشد (Mohamadi Javidi, 2011). تعداد کروموزوم‌های پایه $x=8$ می‌باشد. همچنین بر اساس داده‌های سیتولوژی، اغلب به صورت دیپلوئید بوده و حالت تتراپلوئید یا پلی‌پلوئید در آنها کمتر به چشم می‌خورد (Masumi, 2003, Dane et al., 2007).

تنوع ژنتیکی و پروتئینی یک صفت، ارزش متفاوت افراد یا ژنوتیپ‌ها برای آن صفت می‌باشد (Bagheri et al., 1996). نشانگرهای پروتئینی نشانگرهایی هستند که چندشکلی بین افراد را در سطح پروتئین و آنزیم نشان می‌دهند و دارای توارث هم‌باز هستند. از جمله این نشانگرها می‌توان به پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر، ایزوآنزیم‌ها

مولکولی مشخص به عنوان لدر در اولین چاهک بارگیری شد. الکتروفورز با ولتاژ ۹۰ ولت در ژل متمرکز کننده به مدت ۲ ساعت و با ولتاژ ۲۵۰ ولت در ژل جدا کننده به مدت ۳ ساعت انجام شد. رنگ آمیزی ژل توسط روش کوماسی بریلیانت بلو جی ۲۵۰ (آب مقطر، متانول، اسید استیک خالص و کوماسی بریلیانت بلو جی ۲۵۰) انجام شد و ژل به مدت ۱۶ ساعت درون این محلول روی دستگاه همزن مغناطیسی قرار گرفت. به منظور وضوح باندهای پروتئین، رنگ زدایی در محلول رنگ بر (آب مقطر، متانول و اسید استیک خالص) انجام گردید و ژل به مدت ۲-۳ ساعت یا بیشتر درون محلول روی دستگاه همزن مغناطیسی قرار گرفت تا زمینه ژل کاملاً شفاف شود. سپس ژل اسکن شده و مورد مطالعه قرار گرفت. پس از اتمام ژل گذاری، باندهای حاصل از لحاظ تنوع و غلظت مورد مقایسه قرار گرفتند. در این مطالعه دو مجموعه آنالیز بر روی باندهای پروتئینی انجام شد. در آنالیز اول، امتیازدهی باندها به صورت کد صفر (عدم وجود باند) و یک (وجود باند) در برنامه Excel وارد شد. نمودار خوشه‌ای و تجزیه به مؤلفه‌های اصلی با استفاده از نرم افزار NTSYS ver.2.02 انجام شد. تجزیه خوشه‌ای براساس ضریب تشابه دایس انجام گردید و دندروگرام به روش UPGMA ترسیم شد. محتوای اطلاعات چندشکلی با استفاده از فرمول ساده $PIC = 2fi(1 - fi)$ که در آن fi درصد i امین نوار تکثیر شده است، محاسبه شد.

در آنالیز دوم، پس از شناسایی لاین‌های پیتیدی با حجم بیان متفاوت، حجم بیان پیتیدهای هدف با استفاده از نرم افزار اندازه‌گیری میزان بیان، اندازه‌گیری و بعد نمودارهای آنالیزی مربوط به هر لاین رسم شد که به دلیل قدرت بالای آنالیز از نرم افزار PhoretixPro استفاده گردید.

نتایج

تفکیک پروتئین‌های ۱۳ نمونه *A. hamosus*، حاصل از الکتروفورز در ژل ۱۲/۵ درصد پلی‌اکریل‌آمید جداکننده با استفاده از روش رنگ آمیزی کوماسی بریلیانت بلو جی ۲۵۰

ایران انجام نشده است، بر این اساس بررسی تنوع پروتئینی در بین جمعیت‌های *A. hamosus* و میزان بیان پیتیدهای متفاوت در آنها از اهداف این مطالعه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

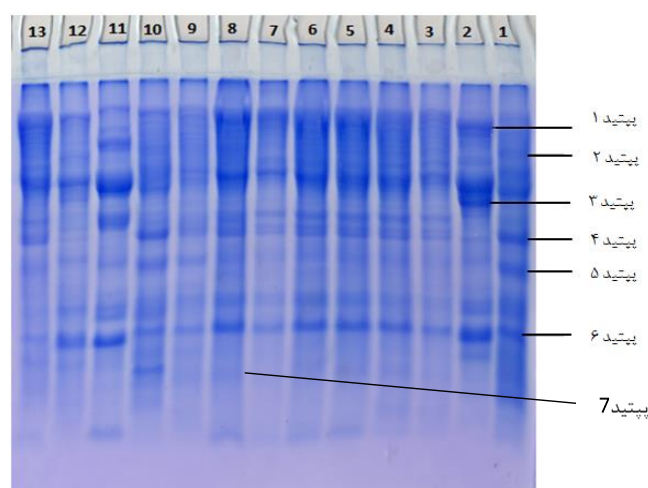
این مطالعه در ۱۳ نمونه *A. hamosus* (جدول ۱)، در مرکز تحقیقات کشاورزی اصفهان در سال ۱۳۹۵ انجام شد. استخراج پروتئین‌های بذری با دو روش تریس و فنول انجام و هر یک از نظر کمیت و کیفیت باندهای پروتئینی حاصل به روش SDS-PAGE بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید بررسی شدند، به طوری که در نهایت روش فنول بهترین جواب را ایجاد کرد و این حداکثر کمیت استخراج پروتئین از بافت‌های گیاهی با استفاده از روش فنول می‌باشد که با نظر Pavokovi و همکاران (۲۰۱۲) مطابقت داشت. سپس غلظت پروتئین‌ها بوسیله آزمایش برادفورد و پروتئین‌های استاندارد سرم آلبومین گاوی تعیین شد (Bradford, 1976). به این ترتیب که محلول‌های پروتئین استاندارد در دستگاه اسپکتروفتومتر قرار داده شد و میزان جذب نور توسط دستگاه با طول موج ۵۹۵ نانومتر نمایش داده شد. برای هر نمونه یک استاندارد ثبت شد و با استفاده از غلظت پروتئین‌های معلوم خط رگرسیون ترسیم گردید. سپس منحنی استاندارد با رسم مقادیر خوانده شده توسط دستگاه در مقابل غلظت‌های معلوم آنها رسم شد. پس از آن معنی‌دار بودن ضریب رگرسیون و عرض از مبدأ این خط نیز مورد آزمون قرار گرفت و پس از مشخص شدن رابطه نهایی خط، غلظت پروتئین در نمونه‌های مورد بررسی تعیین شد. برای هم غلظت کردن پروتئین‌ها برای بردن روی ژل، از فرمول $M1V1 = M2V2$ (=V حجم و =M مولاریته) استفاده شد.

الکتروفورز ژل SDS-PAGE تک‌بعدی، شامل ژل متمرکز کننده (۵٪) و ژل جدا کننده (۱۲٪/۵) بود، به این ترتیب که پس از آماده‌سازی ژل، نمونه‌ها در بافر رنگ (Dye) قرار گرفت و به مقدار ۳۰ میکرولیتر از هر نمونه با غلظت یکسان روی ژل بارگذاری شد. به منظور تعیین وزن مولکولی پروتئین‌ها، یک نشانگر دارای پروتئین‌هایی با وزن

در شکل ۱ آمده است. دامنه انتخاب باندها ۱۴kDa-۲۵۰ بود. در مجموع ۲۸ باند چند شکلی تولید نمودند که ۷۱٪ (درصد چندشکلی) از کل ۳۹ عدد باند تولید شده را شامل گردید. البته هر چه میزان محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) بالاتر باشد نمایانگر قدرت تمایز بیشتر نشانگر می باشد.

جدول ۱- کد ژنوتیپ‌ها و محل جمع‌آوری ۱۳ ژنوتیپ ناخنک (*Astragalus hamosus*)

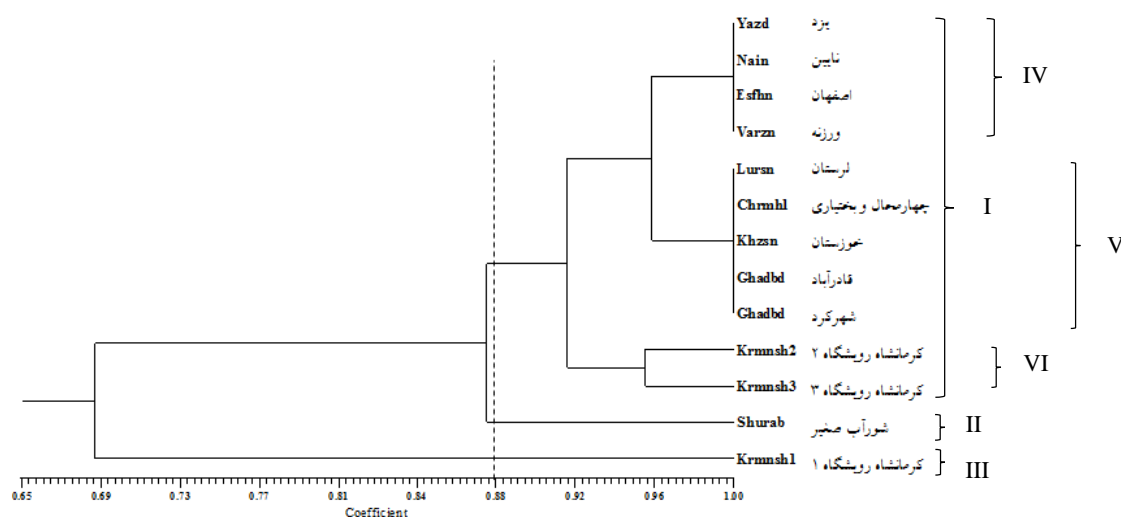
ردیف	کد اختصاری	استان	محل جمع‌آوری بذر	کد بانک ژن	منبع تهیه بذر
۱	Lursn	لرستان	خرم‌آباد	۲۷۹۳۳	بانک ژن منابع طبیعی
۲	Khzsn	خوزستان	دزفول	۲۴۳۵	بانک ژن منابع طبیعی
۳	Krmnsh2	کرمانشاه	کرمانشاه (رویشگاه ۲)	۳۲۹۲۰	بانک ژن منابع طبیعی
۴	Chrmhl	چهارمحال و بختیاری	شهرکرد	۲۹۵۸۹	بانک ژن منابع طبیعی
۵	Ghadbd	چهارمحال و بختیاری	روستای قادرآباد	-	رویشگاه طبیعی گون
۶	Nain	اصفهان	ناین	-	شرکت پاکان بذر اصفهان
۷	Krmnsh3	کرمانشاه	کرمانشاه (رویشگاه ۳)	۳۲۸۸۹	بانک ژن منابع طبیعی
۸	Yazd	یزد	یزد	-	بانک ژن شهید فزوه اصفهان
۹	Esfn	اصفهان	اصفهان	-	بانک ژن شهید فزوه اصفهان
۱۰	Krmnsh1	کرمانشاه	کرمانشاه (رویشگاه ۱)	۳۲۹۲۰	بانک ژن منابع طبیعی
۱۱	Varzn	اصفهان	ورزنه	-	رویشگاه طبیعی گون
۱۲	Shurab	چهارمحال و بختیاری	روستای شوراب	-	رویشگاه طبیعی گون
۱۳	Sharkrd	چهارمحال و بختیاری	شهرکرد	-	رویشگاه طبیعی گون



شکل ۱- الگوی باندهای حاصل از الکتروفورز محصولات پروتئین ۱۳ اکوتیپ *A. hamosus* در ژل ۱۲/۵ درصد پلی‌اکریل‌آمید جداکننده

میزان برای جداسازی اکوتیپ‌ها و مناطق مورد آزمون می‌باشد. در این مطالعه خط شاخص در ضریب تشابه ۸۸ درصد، دندروگرام را به ۳ زیرگروه تقسیم کرد. زیرگروه اول شامل ۱۱ اکوتیپ بود که قسمت عمده‌ای از اکوتیپ‌ها را با حداقل ۹۱ درصد تشابه شامل می‌گردد. به طوری که به جز اکوتیپ شوراب و اکوتیپ ۱ کرمانشاه سایر اکوتیپ‌ها در این دسته قرار گرفتند. در زیرگروه دوم تنها اکوتیپ شوراب از توابع شهرکرد قرار گرفت. به طوری که در ۷۱ درصد تشابه از زیرگروه اول جدا شد و زیرگروه سوم به نحوی از سایر گروه‌ها جدا شد تا جایی که تنها اکوتیپ ۱ کرمانشاه در تشابه ۶۸ درصد از سایر زیرگروه‌ها جدا گردید.

در این تحقیق PIC برابر ۰/۴۹ بود و شاخص نشانگر (MI) که یک معیار برای تعیین کارایی نشانگر در تخمین چندشکلی می‌باشد، برابر ۲۱/۸ محاسبه شد. برای تعیین ارتباط ژنتیکی اکوتیپ‌ها، تجزیه خوشه‌ای به انواع روش-های دایس، جاکارد و ضریب تطابق ساده انجام شد و به منظور مقایسه دندروگرام‌های بدست آمده از الگوریتم‌های خوشه‌ای مختلف با استفاده از آزمون ضریب همبستگی، ضریب کوفنتیک محاسبه گردید. بهترین ضریب تشابه، ضریب تشابه دایس به روش UPGMA بود که ضریب کوفنتیک آن برابر ۹۸ درصد (برازش خیلی خوب) محاسبه شد. در نتیجه کارایی مناسب این روش برای گروه‌بندی اکوتیپ‌ها استفاده گردید (شکل ۲). خط شاخص، بهترین

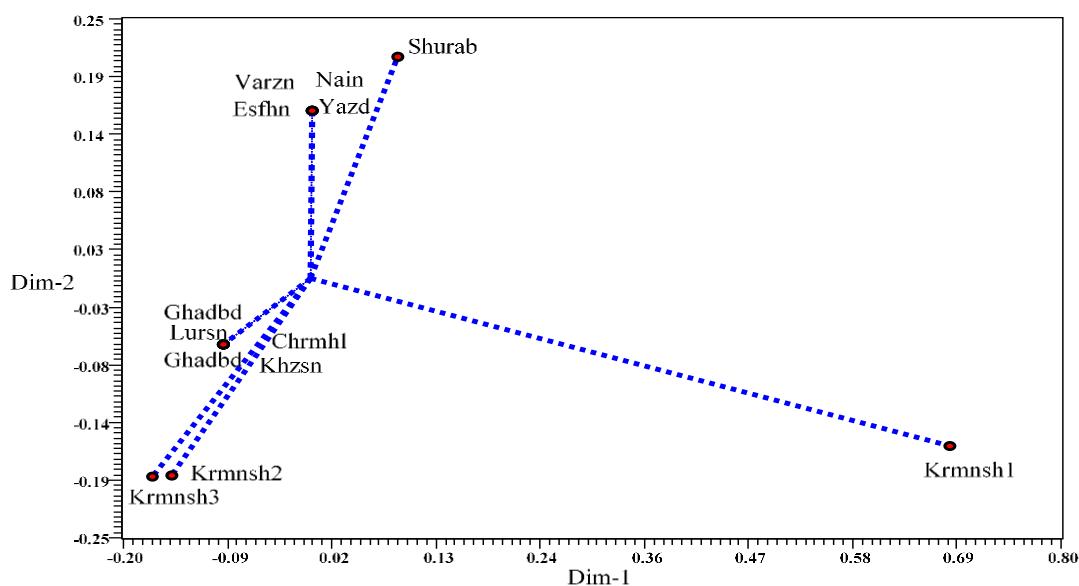


شکل ۲- دندروگرام حاصل از الگوی چندشکلی ۱۳ اکوتیپ *A. hamosus* به روش UPGMA

همچنین نحوه گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها در تجزیه مؤلفه‌های اصلی با گروه‌بندی تجزیه خوشه‌ای مطابقت داشت که بیانگر دقت بالای نشانگرهای پروتئینی و انتخاب مناسب ضریب تشابه بوده است. نتایج بدست آمده نشان داد که اکوتیپ‌هایی که فاصله ژنتیکی کمتری دارند بهم نزدیکتر بوده و در یک گروه قرار می‌گیرند. به طوری که اکوتیپ ۱ کرمانشاه با تفاوت نسبتاً زیاد از سایر اکوتیپ‌ها قرار گرفته است (شکل ۳).

تجزیه مؤلفه‌های هماهنگ اصلی (PCA Corr)

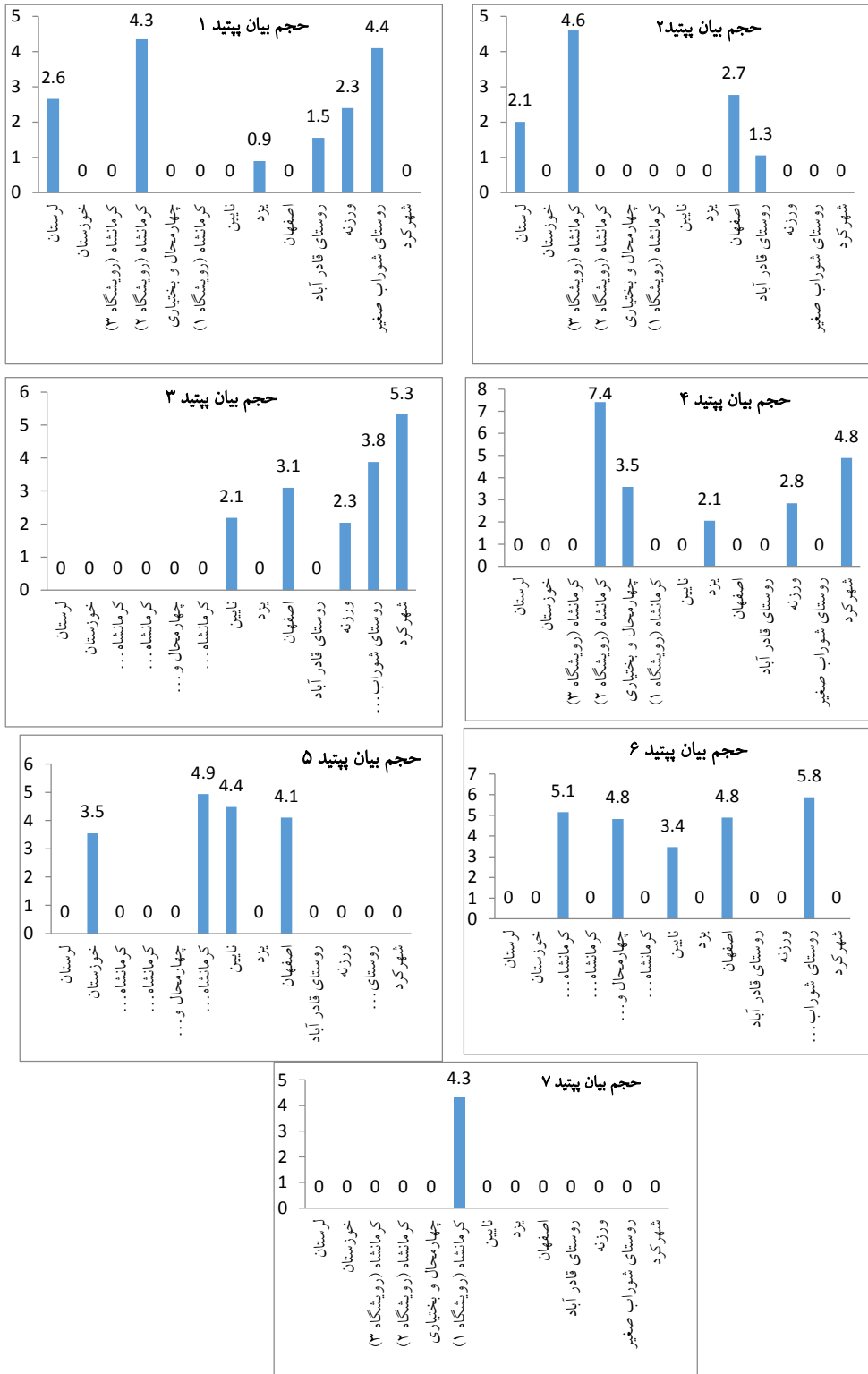
برای بررسی توزیع فضایی اکوتیپ‌ها با مقایسه فواصل فضایی و فواصل ژنتیکی آنها، از تجزیه مؤلفه‌های اصلی استفاده شد. در این تحقیق نتایج حاصل از تجزیه مؤلفه‌های اصلی نشان داد که سه مؤلفه اول ۹۱/۲ درصد از کل تغییرات را بین ۱۳ اکوتیپ *A. hamosus* توجیه نمود. سهم مؤلفه اول به تنهایی ۴۹/۶ درصد بود، سهم مؤلفه دوم و سوم نیز به ترتیب ۲۳/۴ و ۱۸/۱ درصد از کل تغییرات بود.



شکل ۳- نمودار دو بعدی تجزیه مؤلفه‌های اصلی ۱۳ اکتیپ *A. hamosus* با نرم‌افزار NTSYS

را نشان داد (شکل ۴)، در حالی که اکتیپ‌های شهرکرد، چهارمحال و بختیاری، ورزنه و یزد میزان پایین‌تری از این پپتید را بیان کردند. این پپتید در سایر اکتیپ‌ها بیانی را نشان نداد. نتایج حاصل از شکل (۴)، بالاترین سطوح بیانی پروتئین‌های شماره ۵ در چهار اکتیپ کرمانشاه ۱، ناین، اصفهان و دزفول را نشان داد، به طوری که سایر اکتیپ‌ها بیانی را در این پپتید نشان ندادند. بر اساس نتایج حاصل از پپتید ۶، به جز اکتیپ‌های شوراب، کرمانشاه ۳، اصفهان، چهارمحال و بختیاری و ناین، سایر اکتیپ‌ها بیانی را برای این پپتید نشان ندادند، به طوری که بیشترین بیان مربوط به اکتیپ شوراب بود (شکل ۴). پس از آنالیز باندهای حاصل از پروتئین‌های مختلف گیاه *A. hamosus* در مناطق متفاوت، نکته جالب توجهی به چشم خورد که بیانگر حضور یک نوع پپتید خاص (پپتید ۷) در اکتیپ کرمانشاه ۱ بود، زیرا این نوع پروتئین در هیچ‌یک از سایر اکتیپ‌ها حتی به میزان اندک نیز بیان نشد. در واقع با ظهور این پپتید، پروتئین جدیدی به پروفایل پروتئینی گیاه *A. hamosus* موجود در اکتیپ کرمانشاه ۱ اضافه گردید. البته لازم به ذکر است که پروتئین مذکور در ارتفاعی پایین‌تر از تمامی پروتئین‌ها قرار گرفت (شکل ۴).

نتایج مربوط به میزان بیان پروتئین‌ها در مناطق مختلف در این مطالعه از بین پروتئین‌های بیان شده در گیاه *A. hamosus* هفت لاین پپتیدی که تغییرات آنها بطور محسوس قابل مشاهده بود، انتخاب و میزان تغییرات بیانی آنها در اکتیپ‌های مورد نظر آنالیز و بررسی گردید (شکل ۱). پس از آنالیز حجم بیان پروتئین‌ها با استفاده از نرم‌افزار PhoretixPro، نمودار مقایسه‌ای بین سیزده اکتیپ *A. hamosus* ترسیم و نتایج بدست آمده با یکدیگر مقایسه شدند. بیشترین بیان پپتید ۱ در اکتیپ ۲ کرمانشاه و شوراب و پس از آن اکتیپ خرم‌آباد بالاترین میزان بیان پپتیدها را نشان داد. در اکتیپ‌های دزفول، کرمانشاه ۱ و ۳، چهارمحال و بختیاری، ناین، اصفهان و شهرکرد این پپتید مشاهده نشد (شکل ۴). پپتید ۲، تنها در چهار اکتیپ کرمانشاه ۳، اصفهان، لرستان و روستای قادرآباد بیان قابل ملاحظه‌ای داشتند، در صورتی که در هیچ‌یک از اکتیپ‌های دیگر بیانی مشاهده نشد (شکل ۴). در مورد پپتید ۳، بیشترین میزان حجم بیان در پروتئین‌های متعلق به اکتیپ‌های شهرکرد، شوراب، اصفهان، ناین و ورزنه مشاهده گردید. به طوری که سایر اکتیپ‌ها از لحاظ بیان این پپتید، عملکردی را نشان ندادند (شکل ۴). اکتیپ ۲ کرمانشاه، بیشترین بیان پپتید ۴



شکل ۴- مقایسه میزان بیان پروتئین‌ها در سیزده اکوتیپ مختلف

مانند نشانگر ISSR تنوع بالایی را میان جمعیت‌های یک گونه نشان دهد. محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) در این مطالعه برابر ۴۹ درصد محاسبه شد که البته با توجه به تعداد باندهای حاصل در پروفایل پروتئینی عدد قابل قبولی می‌باشد و تنوع ژنتیکی بالایی میان نمونه‌ها مشاهده می‌شود. Acik و همکاران (۲۰۰۴) با ارزیابی روابط تاکسونومی گونه‌های گون *A. hololeuce* و *A. synochreati* با استفاده از نشانگرهای RAPD، تنوع مورفولوژیکی و پروتئین‌های دانه گزارش کردند که دندروگرام حاصل از فاصله ژنتیکی نی به روش UPGMA برای مقایسه گونه‌ها مناسب‌ترین روش بود. همچنین بر اساس آنالیز پروتئین دانه مشخص شد که همه اکوتیپ‌ها یک الگوی پروتئینی ویژه داشتند که با گروه‌بندی مورفولوژیکی مطابقت داشت. در این تحقیق نیز در میان ضرایب مختلف ضریب تشابه دایس انتخاب شده و مناسب‌ترین روش برای مقایسه نمونه‌ها UPGMA تشخیص داده شد. به دلیل بالا بودن درصد سه مؤلفه اول در آنالیز تجزیه مؤلفه‌های اصلی، می‌توان شاهد مطابقت بالا بین تجزیه خوشه‌ای و تجزیه مؤلفه‌های اصلی بود که این خود بیانگر دقت بالای نشانگرهای پروتئینی و انتخاب مناسب ضریب تشابه بوده است. Knaus و همکاران (۲۰۰۵) با مطالعه رفتار ژنتیکی سه جمعیت از گونه *A. lentiginosus* گزارش کردند که نتایج تجزیه مؤلفه‌های اصلی و تجزیه خوشه‌ای با منشأ جغرافیایی وارپته‌ها مطابقت داشت. همچنین نشانگر AFLP توانایی تشخیص این جمعیت‌ها را دارد و نشانگری مناسب برای تعیین ارتباطات ژنتیکی درون جمعیت‌ها می‌باشد. Bushman و همکاران (۲۰۱۰) در نتیجه بررسی ساختار ژنتیکی ۶۷ جمعیت از *A. filipes* با استفاده از نشانگر AFLP گزارش کردند که اگرچه همبستگی معنی‌داری بین ماتریس فواصل ژنتیکی و فواصل جغرافیایی دیده شد اما همبستگی بین ماتریس‌های فواصل ژنتیکی و اقلیمی (ارتفاع و دما) وجود نداشت. نتایج این تحقیق نشان داد که فواصل جغرافیایی در تمایز ژنتیکی تأثیر دارد. در تحقیقی Anand و همکاران (۲۰۱۰) با استفاده از نشانگرهای RAPD، ISSR و DAMD به بررسی

در مقایسه میزان بیان کل پروتئین‌ها در مناطق مختلف، با توجه به مقایسه آنالیز حجم بیان پپتیدهای مورد بررسی در ۱۳ اکوتیپ، از لحاظ تجمعی بیشترین بیان پپتیدی مربوط به پپتید ۶ با ۲۴۱۹۵ واحد نرم‌افزار PhoretixPro و کمترین بیان تجمعی مربوط به پپتید ۷ با ۴۳۲۸ واحد نرم‌افزار PhoretixPro مشاهده شد. بر اساس آنالیز نمودارها، در کل پپتیدهای بیان شده در اکوتیپ‌های مختلف، بیشترین بیان مربوط به پپتید ۴ از اکوتیپ ۲ کرمانشاه مشاهده گردید (شکل شماره ۴).

بحث

اطلاع از سطح تنوع ژنتیکی منابع گیاهی هر محصول، اولین و مهمترین گام در جهت برآورد اهداف اصلاحی می‌باشد، متعاقباً سطوح بیان پپتیدهای هر منبع گیاهی، تأثیر به‌سزایی در شناسایی گیاهان خالص می‌نماید. در تحقیقی Zoghiami و Zouaghi (۲۰۰۳) به بررسی تنوع مورفولوژیکی دو گونه *A. hamosus* و *Coronilla scorpioides* پرداختند. طول ساقه گل و نیام مانند تعداد گل‌ها مهمترین متغیر تفکیک‌کننده بین جمعیت‌ها بود. در مجموع نتایج نشان داد که تنوع زراعی و مورفولوژیکی قابل توجهی در بین جمعیت‌های دو گونه مشاهده شده است. Vicente و همکاران (۲۰۱۱) با ۸ آغازگر ISSR به بررسی تنوع ژنتیکی و ساختار ۵ جمعیت *A. nitidiflorus* پرداختند، آنان گزارش نمودند که درصد چندشکلی برابر ۵۱/۳٪ بود. در بررسی ۲۲ توده جمعیت متعلق به *A. adsurgens* توسط Huang و همکاران (۲۰۰۹) و با استفاده از نشانگرهای ISSR و RAPD، درصد چندشکلی برای ۱۲ آغازگر ISSR برابر ۷۵ درصد و برای ۱۲ آغازگر RAPD برابر ۶۵ درصد بود. گروه‌بندی دو نشانگر مشابه نبود و در مجموع نتایج حاصل از تنوع ژنتیکی با نشانگر ISSR تمایز بهتری را نسبت به نشانگر RAPD از خود نشان داد. در این مطالعه درصد چندشکلی تقریباً ۷۲٪ بوده و نشان‌دهنده وجود تنوع ژنتیکی بالا در بین جمعیت‌های *A. hamosus* می‌باشد. همچنین نتایج نشان می‌دهد که نشانگر پروتئینی می‌تواند

برخی پیتیدها در مناطق مختلف می‌تواند به شرایط اقلیمی و توپوگرافی رویشگاه بستگی داشته باشد، به طوری که براساس گزارش‌های انجام شده شرایط متفاوت اقلیمی بسیار در تغییر بیان پیتیدها حائز اهمیت می‌باشد (Stillman, 2003). حضور پیتید ۷ در اکوتیپ ۱ کرمانشاه بسیار جالب بود و نکته قابل توجه آنکه جدا شدن این رویشگاه در آنالیز تجزیه خوشه‌ای ارتباط بسیار نزدیکی با نتیجه‌گیری در آنالیز بیانی نشان داد. در واقع به استناد این دو نتیجه، می‌توان به متفاوت بودن گونه یا زیرگونه در این رویشگاه تأکید بیشتری نمود. به طوری که احتمال وجود زیرگونه یا واریته جدیدی از *A. hamosus* در اکوتیپ ۱ کرمانشاه پیشنهاد می‌شود. Xie و همکاران (۲۰۰۹) با استفاده از نشانگر ISSR گزارش نمودند که سه نمونه از گونه *A. membranaceus* دارای تنوع ژنتیکی بالایی بودند، به طوری که هر یک می‌توانند به تنهایی یک واریته باشند. مطابق با نظر این محققان در این مطالعه نیز با توجه به تنوع مشاهده شده در اکوتیپ ۱ کرمانشاه می‌توان به متفاوت بودن این نمونه نسبت به سایر اکوتیپ‌های *A. hamosus* اشاره کرد. با توجه به اینکه اطلاعات زیادی در ارتباط با پیتیدهای *A. hamosus* در دسترس نیست، این مطالعه تلاش کرد حداقل اطلاعات تنوعی و بیانی پیتیدها و رویشگاه‌های مورد بررسی را ارائه نماید.

منابع مورد استفاده:

- Acik, L., Ekici, M. and Celebi, A., 2004. Taxonomic relationships in *Astragalus* sections Hololeuce and Synochreati (Fabaceae): evidence from RAPD-PCR and SDS-PAGE of seed proteins. *Annales Botanici Fennici*, 41: 305-317.
- Allpin, L., Brian, N. and Matheson, T., 2005. Reproductive success and genetic divergence among varieties of the rare and endangered *Astragalus cremnophylax* (Fabaceae) from Arizona, USA. *Conservation Genetics*, 6(5): 803-821.
- Anand, K., Srivastava, R. and Chaudhary, L., 2010. Analysis of Genetic Diversity in *Astragalus rhizanthus* Benth. ssp. *rhizanthus* var. *rhizanthus* (Fabaceae) Using Molecular Markers from India. *Journal of Botany*, pp. 1-9.

تنوع ژنتیکی سه واریته از گونه *A. rhizanthus* پرداختند. نتایج گروه‌بندی تجزیه خوشه‌ای با منشأ جغرافیایی مطابقت داشت و نتایج تنوع ژنی نی و شاخص شانون نشان داد که تنوع ژنتیکی بالایی در بین نمونه‌ها وجود داشت. مطابق با تمامی این مطالعات نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که نشانگر پروتئینی در تفکیک اکوتیپ‌ها بر اساس منشأ جغرافیایی‌شان کارایی بالایی داشته است و این با نتایج Zhao و همکاران (۲۰۰۶) که نشان دادند انطباق بین تنوع ژنتیکی و جغرافیایی تحت تأثیر تبادل مواد ژنتیکی، رانش ژنتیکی و اثر انتخاب طبیعی و یا دخالت بشر قرار دارد، تطابق داشت. همان‌طور که در شکل (۲) مشاهده می‌شود، اکوتیپ‌های متعلق به یزد، نایین، ورزنه و اصفهان که تقریباً در مرکز ایران هستند، همگی در خوشه ۴ قرار گرفته‌اند، همچنین اکوتیپ‌های لرستان، چهارمحال و بختیاری، خوزستان، قادرآباد و شهرکرد که تقریباً در غرب و جنوب غربی ایران هستند، همگی در خوشه ۵ قرار گرفته‌اند و اکوتیپ‌های کرمانشاه ۲ و ۳ نیز در خوشه ۶ قرار دارند. این خوشه‌بندی و نتایج حاصل از تجزیه مؤلفه‌های اصلی با منشأ جغرافیایی نمونه‌ها ارتباط نزدیکی داشته و با اینکه تمامی اکوتیپ‌های این خوشه‌ها در زیرگروه ۱ قرار گرفته‌اند ولی نشانگر پروتئینی توانسته آنها را از یکدیگر بر اساس منشأ جغرافیایی تفکیک نماید. علت قرار گرفتن رویشگاه شوراب با تفاوت بسیار اندک با زیرگروه اول را می‌توان اثر متقابل اکوتیپ و محیط تلقی نمود. همچنین اکوتیپ ۱ کرمانشاه با تفاوت معنی‌دار ۳۲ درصد از سایر اکوتیپ‌ها تفکیک شد. به دلیل بالا بودن این تفاوت احتمال جدا شدن گونه در این اکوتیپ وجود دارد. یادآوری می‌شود که بذره‌های مربوط به این اکوتیپ جزء اکوتیپ‌های تهیه شده از بانک ژن مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور بود، بر این اساس می‌توان قدرت بالای نشانگرهای پروتئینی را در تفکیک گونه‌ها بیان داشت و درصد خطای این گونه‌ها را با استفاده از این نشانگر برطرف نمود، به طوری که این نشانگر قادر به استفاده در معتبرترین منابع بذری کشور یعنی بانک ژن، برای جداسازی و شناسایی گونه‌ها می‌باشد. عدم بیان

- Recalcitrant Plant Tissues. *Croatica Chemica Acta*, 85(2): 177-183.
- Rahim Malek, M., Fazilati, M., Gharibi, SH. and Vahabi, M., 2011. Evaluation of Genetic Variation of Yellow and White *Astragalus* (*Astragalus* sp.) in Protected Regions of Isfahan Province Using ISSR Marker. *Journal of Crop Production and Processing*, 1(1):25-34.
 - Soltani, A., 2004 Traditional medicine (Medicinal plant), Arjmand publication, The first Vol A-B.(In Persian)
 - Stillman, J., 2003. Acclimation capacity underlies susceptibility to climate change. *Science*, 301(5629): 65-65.
 - Vicente, M., Segura, F., Aguado, M., Migliaro, D., Franco, J. and Martinez-Sanchez, J., 2011. Genetic diversity of *Astragalus nitidiflorus*, a critically endangered endemic of SE Spain, and implications for its conservation. *Biochemical Systematics and Ecology*, 39: 175-182.
 - Walker, G. and Metcalf, A., 2008. Genetic Variation in the Endangered *Astragalus jaegerianus* (Fabaceae, Papilionoideae): A Geographically Restricted Species. *Bulletin, Southern California Academy of Sciences*, 107(3): 158-177.
 - Xie, X., Hu, Y., Wang, L., Yang, J., Li, Y. and Peng, M., 2009. Genetic diversity in three morphological types of *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao as revealed by inter simple sequence repeat markers. *African Journal of Biotechnology*, 8(18): 4490-4494.
 - Zarre, Sh., Khodaei, Z., Karamali, Z., Niknam, V. and Mirmasoumi, M., 2007. Isolation variation pattern and species concept in *Astragalus gossypinus* and *Astragalus persicus* complexes (Fabaceae) in Iran. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35:757-763.
 - Zhao, W., Zhang, J., Wangi, Y., Chen, T., Yin, Y., Huang, Y., Pan, Y. and Yang, Y., 2006. Analysis of genetic diversity in wild populations of mulberry from western part of Northeast China determined by ISSR Markers. *Genetics and Molecular Biology*, 17: 196-203.
 - Zoghiami, A. and Zouaghi, M., 2003. Morphological variation in *Astragalus hamosus* L. and *Coronilla scorpioides* L. populations of Tunisia. *Euphytica*, 134: 137-147.
 - Bagheri, A., Kochaki, A. Zand, A. 1996. Plant breeding in sustainable agriculture. Mashad Jahad Danshgahhi publication Mashad, Iran (In Persian).
 - Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248-254.
 - Bushman, B., Bhattarai, K. and Johnson, D., 2010. Population structures of *Astragalus filipes* collections from western North America. *Botany*, 88(6): 565-574.
 - Chavla, Ch., 2003. Introduction Biotechnology Plant. (Translated by Farsi, M. and Zolali M.), Mashad Jahad Daneshgahi publication, Mashad, Iran. (In Persian).
 - Dane, F., Aksoy, O. and Yilmaz, G., 2007. Karyological and palynological studies on *Astragalus hamosus* and *A. glycyphyllos* in Turkey. *Phytological Balcanica*, 13 (3): 387-391.
 - Huang, L., Chen, Zh., Zhang, Xi., Wang, Zh. and Liu, Ch., 2009. A Comparative Analysis of Molecular Diversity of Erect Milkvech (*Astragalus adsurgens*) germplasm from North China Using RAPD and ISSR Markers. *Biochemical Genetics*, 47: 92-99.
 - Knaus, B., Cronn, R. and Liston, A., 2005. Genetic characterization of three varieties of *Astragalus lentiginosus* (Fabaceae). *Brittonia*, 57(4): 334-344.
 - Krasteva-Platikanov, S., Nikolav, S. and Kologa, M., 2007. Flavonoid from *Astragalus hamosus*. *Natural Product Research*, 21:392-395.
 - Luo, M., Hwu, K. and Huang, T., 2000. Taxonomic study of Taiwan *Astragalus* based on genetic variation. *Taxon*, 49: 35-46.
 - Masumi, A., 2003. Iranian Flora, Papilionaceae, *Astragalus*, Research institute of Forests and Rangelands. NO, 43.
 - Mohamadi Javidi, R., 2011. Medicinal plant and fruits, Aftab Ghoban publication, 389 Pp. (In Persian)
 - Patane, C. and Gresta, F., 2006. Germination of *Astragalus hamosus* and *Medicago orbicularis* as affected by seed-coat dormancy breaking techniques. *Journal of Arid Environments*, 67:165-173.
 - Pavokovi, D., Krinik, B., Amvam Zollo, P. and Mothur, S., 2012. Evaluation of Protein Extraction Methods for Proteomic Analysis of Non-Model

Evaluation of protein variation and different peptides expression content in *Astragalus hamosus* L. ecotypes using SDS-PAGE method

H. Zeinali^{1*}, M. Hadi Pour², A. Arti³, M. Sadeghi⁴ and M. Hasan Barani⁵

1- Corresponding author, Associ. Prof., Natural Science Department, Isfahan Agricultural and Natural Resources, Research and Education Center, AREEO, Isfahan, I.R. Iran, E-mail: hoszeinali@yahoo.com

2- M.Sc., Isfahan University of Technology, Isfahan, I.R. Iran.

3- M.Sc., Payam Nour University, I.R. Iran.

4- M.Sc., Ecology systematic of Isfahan university, Isfahan, I.R. Iran.

5- Ph.D. Graduate Plant systematic, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. Iran.

Received: 20.05.2017

Accepted: 15.09.2019

Abstract

Astragalus hamosus L. is an annual, herbaceous belonged to Leguminosae family. Understanding the pattern of plant species diversity is important in breeding programs and leads to awareness of evolutionary processes. This study was conducted on protein diversity of the ecotypes of this plant species. According to the protein variation analysis of *A.hamosus*, the polymorphism index content (PIC) was calculated as 0.49. Cluster dendrogram was drawn using Dice similarity coefficient and UPGMA method. The ecotypes were classified into three subgroups with cophenetic correlation coefficient 0.88. Out of the 13 ecotypes, 11 were grouped together with relatively high similarity. Kermanshah ecotype no1 was significantly separated from other ecotypes. According to the results of the expression of seven peptides studied in 13 ecotypes, the highest and lowest cumulative expression levels belonged to peptides6 and 7 with 24195 and 4328 units by PhoretixPro software, respectively. Based on biplot analysis, the highest expression of peptides in all different ecotypes was related to peptide 4 of Kermanshah ecotype 2. Peptide 7 was not expressed in any other ecotypes, even at very low levels. It was concluded that a new protein was added to the protein profile of *A. hamosus* in the Kermanshah ecotype with the emergence of this peptide.

Keywords: Protein expression, Protein variation, *A. hamosus*, PhoretixPro