

بررسی تنوع پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه و برخی صفات مورفولوژیک گونه‌های مختلف جنس *Papaver*

رضا اشرفی^۱، عبدالله نجفی*^۲، مراد شعبان^۱ و مجتبی فتحی^۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی کرمانشاه

۲- نویسنده مسئول، استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی کرمانشاه
پست الکترونیک: nadjaphy@yahoo.com

۳- کارشناس، شرکت خدمات حمایتی کشاورزی اردبیل

تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹۰

تاریخ اصلاح نهایی: اردیبهشت ۱۳۹۰

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۸۹

چکیده

این آزمایش به منظور بررسی پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه هفت گونه مختلف *Papaver* از مناطق مختلف استان اردبیل با روش SDS-PAGE انجام شد. اطلاعات حاصل از امتیازدهی نوارهای پروتئین‌ها در مجموع ۲۰ مکان را در گونه‌ها شناسایی کرد. بیشترین تعداد نوار مربوط به گونه‌های *P. rhoeas* و *P. bracteatum* با ۱۷ نوار بود. کمترین تعداد نوار مربوط به گونه‌های *P. argemone* و *P. somniferum* با ۱۳ نوار پروتئینی بود. تجزیه خوشه‌ای براساس ماتریس تشابه جاکارد، گونه‌های مختلف را در چهار گروه قرار داد. در گروه اول، *P. somniferum*؛ گروه دوم، *P. oreintale*، *P. bracteatum*، *P. lasiotrix* و *P. rhoeas*؛ گروه سوم، *P. dubium* و در گروه چهارم، *P. argemone* قرار گرفت. گونه‌های مختلف از نظر صفات مورفولوژیک (رنگ و شکل گلبرگ، رنگ و اندازه بذر و ارتفاع گیاه) تنوع خوبی نشان دادند که براساس تجزیه خوشه‌ای گونه‌های مورد بررسی در سه گروه جدا قرار گرفتند. آزمون مانتل برای تعیین ارتباط بین داده‌های مورفولوژیک و پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه انجام شد. این آزمون همبستگی معنی‌داری را بین این دو گروه از داده‌ها نشان نداد که احتمالاً می‌تواند به دلیل تعداد کم صفات مورفولوژیک و کم بودن تعداد نشانگر مولکولی باشد.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه، SDS-PAGE، خشخاش.

مقدمه

انتشار گونه‌های مختلف تیره *Papaveraceae* در کره زمین دارای طیف گسترده‌ای بوده و نیمکره شمالی محل پراکنش طبیعی گونه‌های این تیره است (Mihalik, 1998). گونه‌های این تیره به احتمال زیاد بومی خاورمیانه بوده اما امروزه در مناطق گرمسیری و اروپا نیز مشاهده

می‌شوند. این گیاهان در کشورهایمانند ایران، چین، هند، ژاپن و ترکیه به‌عنوان گیاه دارویی کشت می‌شوند (Bara et al., 2007). خشخاش متعلق به طبقه *Magnoliophyta*، رده *Magnoliopsida*، راسته *Rununculales* و تیره *Papaveraceae* می‌باشد. در جنس *Papaver*، ۱۱ زیرجنس وجود دارد (Kadereit, 1993).

هستند و بیشتر در مراحل پُرسیدن دانه در آن تجمع می‌یابند (Hajduch *et al.*, 2005). روش SDS-PAGE برای خالص سازی، محاسبه مقدار نسبی و تعیین تعداد و وزن مولکولی پروتئین‌ها و پپتیدها بکار می‌رود. به همین دلیل این روش به‌عنوان پر کاربردترین روش در میان روشهای الکتروفورزی مطرح است. در عمل یک رابطه خطی بین میزان حرکت و لگاریتم وزن مولکولی پروتئین‌ها وجود دارد (مصطفائی، ۱۳۸۳).

Boulter و همکاران (۱۹۶۶) در بررسی الگوهای پروتئینی در سیستم‌های گیاهی به این نتیجه رسیدند که الگوهای پروتئینی در سیستم‌های گیاهی دارای کاربرد متفاوتی از لحاظ نوارهای پروتئینی بوده، به طوری که اگر نوارها دارای حرکت یکسان در داخل ژل باشند، با هم مشابهند. با فرض اینکه پروتئین‌ها محصولات مستقیم ژن هستند، هر یک از نوارها بیانگر تظاهر یک صفت می‌باشند. بنابراین تفاوت در الگوهای پروتئینی نمایانگر اختلافات ژنتیکی معنی‌دار در بین افراد جمعیت می‌باشد.

Srinivas & Narasinga Rho (۱۹۸۱) با مطالعه ترکیب‌های بذر ۳ واریته خشخاش زراعی گزارش کردند که واریته‌های تجاری به مراتب دارای روغن و پروتئین کمتری هستند. با الکتروفورز پروتئین به روش SDS-PAGE یک نوار بزرگ و چندین نوار کوچک مشاهده شد و با تجزیه آنها مشخص شد که پروتئین‌های خشخاش غنی از آسپارتیک اسید، گلوتامیک اسید و آرژنین هستند. همچنین در مطالعه دیگری بر روی پروتئین‌های با وزن مولکولی کم خشخاش زراعی با استفاده از الکتروفورز به روش SDS-PAGE نشان داده شد که این پروتئین‌ها

نگاهی به تقاضای قانونی سالیانه ۷۰۰ تن مورفین در جهان نشان می‌دهد که توجه به تولید خشخاش امری ضروریست، زیرا آلکالوئیدهای Papaver در هیچ گونه گیاهی دیگر، به غیر از این جنس وجود ندارد. تنها گونه‌ای که توانایی تولید مورفین به صورت تجاری را دارد، *Papaver somniferum* می‌باشد و بقیه تنها می‌توانند آلکالوئیدهای حد واسط (با توجه به این که توانایی تبدیل شدن به مورفین را در کارخانه‌های داروسازی دارند) را تولید کنند (Sariyar, 2002).

تنوع ژنتیکی اساس بیشتر برنامه‌های اصلاحی بوده و انجام گزینش منوط به وجود تنوع ژنتیکی مطلوب از نظر ویژگی‌های مورد بررسی می‌باشد (محمدی، ۱۳۸۵). مطالعه تنوع ژنتیکی فرایندی است که تفاوت یا شباهت گونه‌ها، جمعیت‌ها و یا افراد را با استفاده از روشها و مدل‌های آماری خاص براساس صفات مورفولوژیک، اطلاعات شجره‌ای یا خصوصیات مولکولی افراد بیان می‌کند (Mohammadi & Prasanna, 2003). نشانگرهای بیوشیمیایی به‌ویژه پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر از جمله نشانگرهای مولکولی هستند که برای تعیین تنوع چند شکلی آنها از تکنیک الکتروفورز استفاده می‌شود (Weising *et al.*, 2005). نشانگرهای پروتئینی فرآورده نهایی ژنهای ساختاری بوده که در واقع بیانگر تنوع موجود در سطح توالی نوکلئوتیدی ژنوم هستند (عبدمیشانی و شاه نجات بوشهری، ۱۳۷۷).

الکتروفورز پروتئین‌های بذر در مطالعات شیمیوتاکسونومی کاربرد وسیعی دارد (خیامی و همکاران، ۱۳۸۴). پروتئین‌های ذخیره‌ای از پروتئین‌های غیر آنزیمی

باتوجه به این که تاکنون گزارشی در مورد بررسی تنوع ژنتیکی گونه‌های مختلف جنس *Papaver* با استفاده از نشانگرها در ایران ارائه نشده است، این مطالعه با هدف بررسی تنوع ژنتیکی گونه‌های مختلف *Papaver* با استفاده از پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه و برخی صفات مورفولوژیک انجام شد.

مواد و روشها

این مطالعه بر روی ۷ گونه از جنس *Papaver* که از مناطق مختلف استان اردبیل که در سال ۱۳۸۷ جمع‌آوری شده بود، انجام شد. شناسایی گونه‌ها از طریق ویژگی‌های گیاه‌شناسی انجام شد. بعد از شناسایی گونه‌ها موقعیت و محل جغرافیایی آنها یادداشت گردید و در مرحله رسیدگی، از نمونه‌ها بذر گرفته شد. با استفاده از بینوکولار طول ۱۰ بذر اندازه‌گیری شد و از بذرها با کیفیت مناسب، عکس تهیه شد. مشخصات گونه‌های مورد بررسی در جدول ۱ درج شده است.

استخراج پروتئین

برای تعیین مقدار کمی پروتئین‌ها از روش برادفورد استفاده شد. برای استخراج پروتئین ابتدا نمونه‌ها پودر شد و بعد ۱۰ میلی‌گرم از آرد نمونه در داخل میکروتیوب ریخته شد و پس از اضافه نمودن ۶۰۰ میکرولیتر بافر استخراج پروتئین (گلیسرول ۱۰٪، بتا-مرکاپتواتانول ۰٫۵٪، اوره ۵ مولار و برومو فنول بلو ۰٫۰۱۰۰۰٪) ورتکس گردید تا پروتئین خام آن جدا شود. سپس نمونه‌ها در سانتریفیوژ با ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد (Walker, 2002).

شامل اسیدهای آمینه سیستئین، اسید گلوتامیک، آرژنین و مقادیر کمتری اسید آسپارتیک، لوسین، ایزولوسین، والین، هیستیدین، تریپتوفان و فنیل آلانین بودند (Srinivas & Narasinga Rho, 1987). Nessler (۱۹۹۸) با تجزیه الکتروفورزی پروتئین‌های بزرگ خشخاش نشان داد که این پروتئین‌ها به‌طور مرتب در لاتکس بیان می‌شوند، از این رو نشانگرهای خوبی برای توسعه شیرابه‌ها هستند.

Brezinova و همکاران (۲۰۰۹) از صفات مورفولوژیک کمی و کیفی برای بررسی تنوع ۴۰۴ ژنوتیپ خشخاش زراعی استفاده کرد. این پژوهشگران ارتفاع بوته، تعداد کپسول در هر گیاه، وزن هزاردانه، اندازه کپسول، وزن بذر در هر کپسول و وزن هر کپسول را ویژگی‌های مناسبی برای بررسی تنوع قلمداد کردند. Carolan و همکاران (۲۰۰۲) با بررسی تنوع ژنتیکی گونه‌های جنس *Papaver* که حاصل کشت درون شیشه‌ای بودند و استفاده از نشانگرهای AFLP، گزارش کردند که گونه‌های *Papaver bracteatum*، *Papaver orientale* و *Papaver pseudo-orientale* در یک گروه و گونه‌های *Papaver somniferum* و *Papaver pseudo-orientale* هر کدام در یک گروه جداگانه قرار دارند. Shanker Acharya و Sharma (۲۰۰۹) ویژگی‌های مولکولی ژنوتیپ‌های خشخاش زراعی را با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR مورد بررسی قرار دادند. تجزیه کلاستر براساس داده‌های نشانگر RAPD ژنوتیپ‌ها را در ۴ گروه جداگانه قرار داد در حالی که تجزیه کلاستر براساس داده‌های نشانگر ISSR ژنوتیپ‌ها را در دو گروه جداگانه قرار داد. براساس داده‌های این دو نشانگر تنوع ژنتیکی پایینی در بین ژنوتیپ‌ها وجود داشت.

جدول ۱- مشخصات جغرافیایی منطقه، ویژگی‌های گیاه‌شناسی و محل جمع‌آوری

گونه‌های مختلف جنس *Papaver*

نام گونه	محل جمع‌آوری	مشخصات جغرافیایی منطقه	تعداد کروموزوم	ویژگی گیاه‌شناسی
<i>P. bracteatum</i>	خلخال	37/34 N, 48/36 E, h=1978m	۲n=۱۴	کپسول درشت، در انتها دارای براکته و برگها پوشیده از کرک
<i>p. oreintale</i>	دریاچه نئور اردبیل	37/58 N, 48/32 E, h=2498m	۲n=۲۸	کپسول متوسط، در انتها بدون براکته و برگها پوشیده از کرک
<i>p. lasiotrix</i>	نمین	38/18 N, 48/33 E, h=1320m	۲n=۲۸	رنگ گل نارنجی و گلبرگها جدا از هم
<i>p. dubium</i>	پارس‌آباد	39/37 N, 47/55 E, h=56m	۲n=۱۴	چهار خال سیاه در انتهای گلها و برگها کرک‌دار
<i>p. rhoeas</i>	گرمی	39/00 N, 48/05 E, h=997m	۲n=۱۴	گل رزی شکل، برگها بدون کرک و دارای دوخال کوچک در طرفین
<i>p. argemone</i>	مشکین شهر	38/32 N, 47/50 E, 1120m	۲n=۱۴	کپسول خاردار و خال سیاه یا آبی در بالای کپسول
<i>p. somniferum</i>	گونه زراعی	-	۲n=۲۲	گلها درشت و رنگ آن سفید یا قرمز مایل به بنفش

الکتروفورز نمونه‌ها

رنگ‌آمیزی

برای الکتروفورز نمونه‌ها مقدار ۱۰ میکرولیتر از نمونه‌ها با سرنگ هامیلتون به داخل ژل بالای (ژل ۱۲٪) تزریق شد. تانک به ولتاژ ۵۰ ولت وصل گردید و پس از ورود نمونه‌ها به ژل پایینی (ژل ۵٪)، ولتاژ به ۱۰۰ ولت تغییر داده شد. بعد از رسیدن نمونه‌ها به پایین ژل ولتاژ قطع و ژل جدا گردید (Walker, 2002).

ژل در داخل محلول رنگ کماسی برلیانت بلو (G-250) به مدت یک ساعت قرار داده شد. سپس ژل به محلول رنگ‌بر به مدت یک شب برای ظهور و تثبیت باندها منتقل گردید. حرکت نسبی (Rf) نوارها از روی تصویر ژل و طبق فرمول زیر تعیین کرد:

مسافت طی شده توسط رنگ نشانگر / مسافتی که هر نوار پروتئینی طی کرده = Rf

با توجه به اطلاعات مربوط به وزن نشانگرهای مولکولی (۷۸، ۶۳، ۴۵، ۲۳، ۱۸، ۱۴ و ۴ کیلو دالتون) و Rf پروتئین‌های استاندارد، منحنی استاندارد روی کاغذ نیمه لگاریتمی ترسیم شد. محور این منحنی به اوزان مولکولی اختصاص داشت. وزن مولکولی پروتئین‌های مورد مطالعه از روی منحنی استاندارد محاسبه شد. برای تعیین وزن مولکولی پروتئین‌ها در ژلهای دارای شیب غلظت (خطی یا غیرخطی) اکریل آمید از فرمول

با توجه به اطلاعات مربوط به وزن نشانگرهای مولکولی (۷۸، ۶۳، ۴۵، ۲۳، ۱۸، ۱۴ و ۴ کیلو دالتون) و Rf پروتئین‌های استاندارد، منحنی استاندارد روی کاغذ نیمه لگاریتمی ترسیم شد. محور این منحنی به اوزان مولکولی اختصاص داشت. وزن مولکولی پروتئین‌های مورد مطالعه از روی منحنی استاندارد محاسبه شد. برای تعیین وزن مولکولی پروتئین‌ها در ژلهای دارای شیب غلظت (خطی یا غیرخطی) اکریل آمید از فرمول

تجزیه و تحلیل‌های آماری داده‌ها

الگوهای نواربندی به صورت صفر و یک امتیازدهی شدند. با استفاده از ضریب تشابه جاکارد، ماتریس تشابه

P. rhoeas است که از لحاظ تعداد نوار پروتئینی به ترتیب ۱۶ و ۱۷ نوار بیشترین نوار پروتئینی را دارا بودند. گونه‌های *P. argemone* و *p. somniferum* کمترین مقدار و کمترین تعداد نوارهای پروتئینی (۱۳ نوار) را داشتند (جدول ۳).

تجزیه خوشه‌ای براساس ماتریس ضرایب تشابه جاکارد حاصل از داده‌های صفر و یک نوارهای پروتئینی گونه‌های مورد بررسی را در ۴ گروه جداگانه قرار داد. در گروه اول *P. somniferum*، گروه دوم *P. oreintale*، *P. bracteatum*، *P. lasiotrix* و *P. rhoeas*، گروه سوم *P. dubium* و در گروه چهارم *P. argemone* قرار گرفت (شکل ۳). نتایج تجزیه به مؤلفه‌های هم‌هنگ اصلی (PCA) براساس ماتریس تشابه جاکارد نیز گونه‌ها را در ۴ گروه جداگانه قرار داد که با نتایج تجزیه خوشه‌ای مطابقت کامل داشت (شکل ۴). بررسی ماتریس تشابه جاکارد نشان می‌دهد که بیشترین شباهت در گروه دوم مابین گونه *P. bracteatum* و *P. orientale* با ضریب ۰/۹۴ و کمترین شباهت مربوط به گونه‌های *P. rhoeas* و *P. argemone* با ضریب ۰/۵۰ شباهت بود (جدول ۳).

بررسی صفات مورفولوژیک مانند اندازه طول بذر، ارتفاع گیاه، رنگ بذر، رنگ گل و مقدار پروتئین نشان‌دهنده تنوع خوبی بین گونه‌های مورد بررسی بود (جدول ۳، شکل ۷). بنابراین از این صفات می‌توان به‌عنوان شاخص گیاه‌شناسی برای شناسایی ظاهری گونه‌های این جنس استفاده کرد. تجزیه خوشه‌ای براساس روش وارد و با استفاده از مربع فاصله اقلیدسی و با در نظر گرفتن صفات مورفولوژیک انجام شد. گونه‌های مورد بررسی در سه گروه جداگانه قرار

تشکیل شد. پس از بررسی روشهای مختلف تجزیه خوشه‌ای (کلاستر)، CLINK (CL) به‌عنوان مناسبترین روش این تجزیه انتخاب و انجام شد. تجزیه به مؤلفه‌های هم‌هنگ اصلی نیز براساس ماتریس تشابه جاکارد صورت گرفت. این تجزیه‌ها توسط نرم‌افزار NTSYS انجام شدند. تجزیه خوشه‌ای برای صفات مورفولوژیک براساس روش وارد (پس از بررسی تمام روشها) در نرم‌افزار SPSS 16 انجام شد. آزمون مانتل براساس ماتریس تشابه جاکارد برای هر دو داده‌های مورفولوژیک و پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه با نرم‌افزار XLSTAT 2011 انجام شد.

نتایج

با توجه به اطلاعات حاصل از امتیازدهی نوارهای پروتئینی، در مجموع در هفت گونه *Papaver* مورد بررسی ۲۰ مکان یا نوار پروتئینی شناسایی شد (شکل ۱)، که بیشترین تعداد نوار مربوط به گونه‌های *P. rhoeas* و *P. bracteatum* با ۱۷ نوار و کمترین تعداد نوار مربوط به گونه‌های *P. argemone* و *P. somniferum* با ۱۳ نوار پروتئینی بود. آنالیز نوارها براساس الکتروفورز، پروتئین‌های بزرگ و کوچکی را با وزن مولکولی مشخص شناسایی کرد. پروتئین‌های بزرگ (major proteins) دارای نوارهای پُررنگ‌تر و مشخص‌تر هستند و در مکانهای ۸، ۹، ۱۱، ۱۵، ۱۲ و ۱۶ دیده می‌شوند. نوارهای پروتئینی کوچک (minor proteins) در بقیه مکانهای ژل پراکنده بوده و اندازه آنها در جدول ۲ درج شده است. بررسی مقدار کمی پروتئین گونه‌های مختلف *Papaver* نشان داد که بیشترین مقدار پروتئین مربوط به *P. dubium* و

گرفتند. گونه‌های *P. orientale*، *P. bracteatum*، *P. lasiotrix* و *P. argemone*، *P. somniferum* در گروه اول؛ *P. dubium* در گروه دوم و *P. rhoeas* در گروه سوم قرار گرفت (شکل ۵).
 آزمون مانتل برای تعیین ارتباط بین داده‌های مورفولوژیک و پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه انجام شد (شکل ۶). این آزمون همبستگی معنی‌داری را بین این دو گروه از داده‌ها نشان نداد ($r=0/161$).

جدول ۲- تنوع نوارهای پروتئینی بذر گونه‌های مختلف *Papaver* به همراه وزن مولکولی تقریبی

بر حسب کیلو دالتون و حرکت نسبی آنها

(اعداد یک و صفر به ترتیب بیانگر وجود و عدم وجود یک نوار پروتئینی خاص است)

<i>P. lasiotrix</i>	<i>P. rhoeas</i>	<i>P. oreintale</i>	<i>P. bracteatum</i>	<i>P. dubium</i>	<i>P. argemone</i>	<i>P. somniferum</i>	وزن مولکولی	Rf	نوار
۰	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۹۸/۲۲	۰/۱۲	۱
۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۸۸/۱۴	۰/۱۵	۲
۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۷۳/۴۱	۰/۲۰	۳
۱	۱	۱	۱	۰	۰	۱	۶۱/۸۴	۰/۲۵	۴
۱	۱	۰	۰	۰	۰	۱	۵۴/۰۲	۰/۲۹	۵
۰	۰	۰	۰	۰	۱	۰	۵۱/۷۷	۰/۳۱	۶
۱	۱	۱	۱	۰	۰	۱	۴۹/۶۹	۰/۳۲	۷
۰	۰	۰	۰	۱	۱	۰	۴۵/۹۷	۰/۳۵	۸
۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۴۳/۵۴	۰/۳۸	۹
۰	۱	۱	۱	۱	۰	۰	۳۷/۶۶	۰/۴۴	۱۰
۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۳۱/۴۲	۰/۵۴	۱۱
۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۳۰/۰۱	۰/۵۷	۱۲
۱	۱	۱	۱	۱	۱	۰	۲۸/۶۸	۰/۶۰	۱۳
۱	۱	۰	۱	۱	۰	۰	۲۴/۹۶	۰/۶۹	۱۴
۱	۱	۱	۱	۱	۰	۰	۲۳/۴۲	۰/۷۳	۱۵
۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۲۰/۹۲	۰/۷۹	۱۶
۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱۸/۷۲	۰/۸۴	۱۷
۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱۷/۴۸	۰/۸۷	۱۸
۱	۱	۱	۱	۱	۰	۱	۱۵/۷۱	۰/۹۱	۱۹
۱	۰	۱	۱	۱	۱	۱	۱۴/۱۴	۰/۹۶	۲۰

جدول ۳- مقدار پروتئین‌های بذر (بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به همراه میانگین

طول بذر، ارتفاع، رنگ گل و رنگ بذر گونه‌های مختلف *Papaver*

مقدار پروتئین (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	میانگین ارتفاع گیاه (سانتی‌متر)	رنگ گل	رنگ بذر	طول بذر (میکرومتر)	نام گونه
۸۳۴/۵	۴۸	قرمز	قهوه‌ای پررنگ	۲۹۹±۱۹/۸۷	<i>P. rhoeae</i>
۷۰۵	۱۱۵	نارنجی	قهوه‌ای روشن	۹۹۶±۲۱/۸۳	<i>P. bracteatum</i>
۶۰۴/۵	۳۶	قرمز کم‌رنگ	قهوه‌ای تیره	۸۳۰±۱۸/۹۹	<i>P. argemone</i>
۶۸۰	۴۳	نارنجی	قهوه‌ای روشن	۷۰۰/۵±۱۵/۵۳	<i>P. lasiotrix</i>
۱۰۷۱	۵۲	قرمز	قهوه‌ای کرمی	۸۷۰/۵±۱۷/۷۰	<i>P. dubium</i>
۵۳۸/۵	-	بنفش	سفید	۱۰۳۵±۱۹/۴۳	<i>P. somniferum</i>
۵۷۲	۱۰۶	نارنجی	قهوه‌ای	۹۹۹/۵±۱۷/۰۷	<i>P. orientale</i>

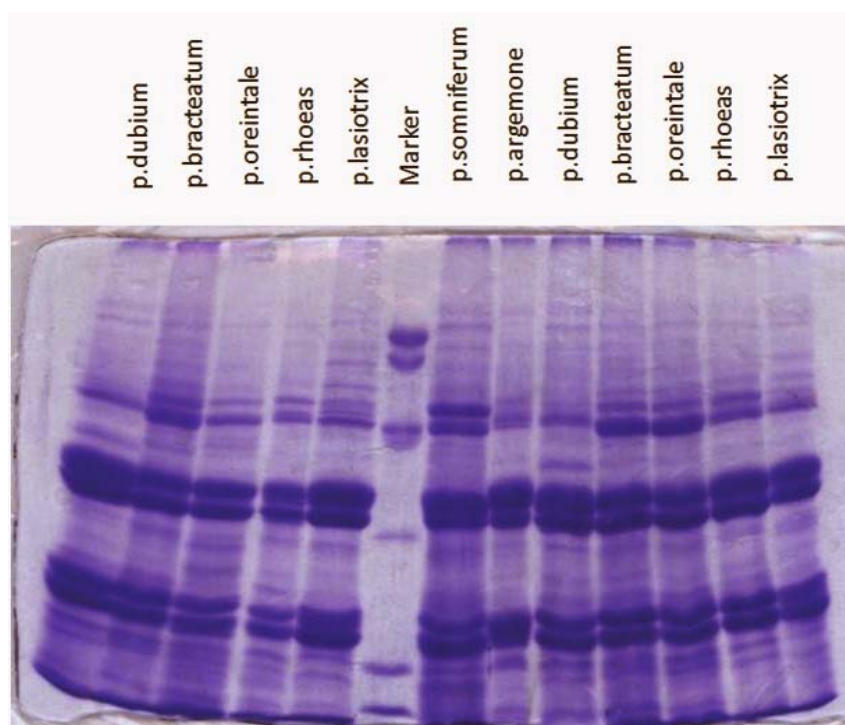
جدول ۴- ماتریس ضرایب تشابه جاکارد گونه‌های مختلف *Papaver*

<i>p. lasiotrix</i>	<i>p. rhoeas</i>	<i>p. orientale</i>	<i>p. bracteatum</i>	<i>p. dubium</i>	<i>p. argemone</i>	<i>p. somniferum</i>	نام گونه
						۱	<i>p. somniferum</i>
					۱	۰/۵۲۹	<i>p. argemone</i>
				۱	۰/۷۰۵	۰/۵۲۶	<i>p. dubium</i>
			۱	۰/۸۳۳	۰/۵۷۸	۰/۶۶۷	<i>p. bracteatum</i>
		۱	۰/۹۴۱	۰/۷۷۸	۰/۶۱۱	۰/۷۰۵	<i>p. orientale</i>
	۱	۰/۸۳۳	۰/۸۸۸	۰/۷۳۶	۰/۵۰	۰/۷۶۴	<i>p. rhoeas</i>
۱	۰/۸۳۳	۰/۷۷۸	۰/۸۳۳	۰/۶۸۴	۰/۵۲۶	۰/۷۰۵	<i>p. lasiotrix</i>

بحث

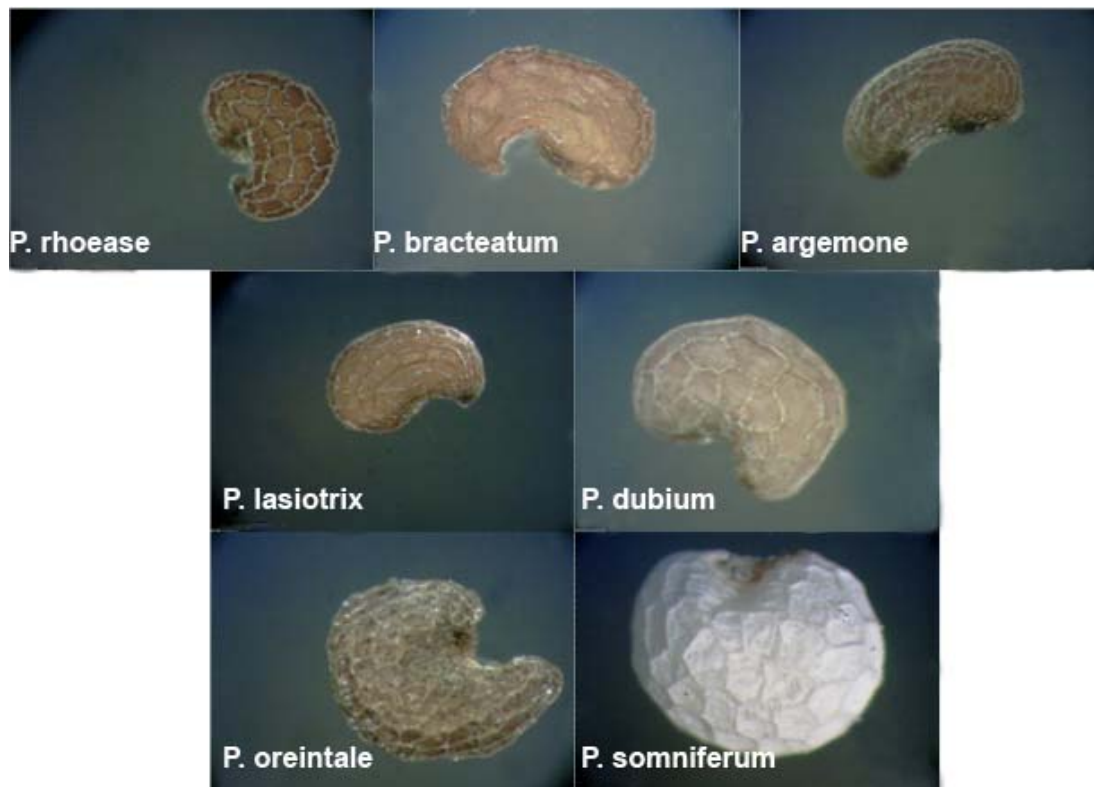
در بخش *Rhoeadium* و گونه *P. argemone* در بخش *Argemonidium* قرار دارد. اما طبقه‌بندی براساس پروتئین‌های ذخیره‌ای *P. rhoeas* را در گروه دوم با گونه‌های بخش *Oxytona* قرار داد. با تجزیه خوشه‌ای براساس صفات مورفولوژیک، گونه‌ها در سه گروه جداگانه قرار گرفتند. این گروه‌بندی با نتایج تجزیه خوشه‌ای براساس پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه مشابهت کمی داشت که از آن جمله می‌توان به قرار گرفتن گونه‌های *P. bracteatum* و *P. oreintale* در یک گروه اشاره کرد.

مطابق بودن نتایج تجزیه خوشه‌ای با نتایج تجزیه به مؤلفه‌های هماهنگ اصلی نشان می‌دهد که گروه‌بندی درست انجام شده است. تجزیه خوشه‌ای براساس پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه تا حد زیادی با تقسیم‌بندی Mihalik (۱۹۹۸) براساس ویژگی‌های گیاه‌شناسی و Carolan و همکاران (۲۰۰۶) براساس توالی DNA مطابقت داشت. در تقسیم‌بندی گیاه‌شناسی گونه *P. somniferum* در بخش *Papaver*، گونه *P. lasiotrix* در بخش *Oxytona*، گونه‌های *P. rhoeas* و *P. dubium*

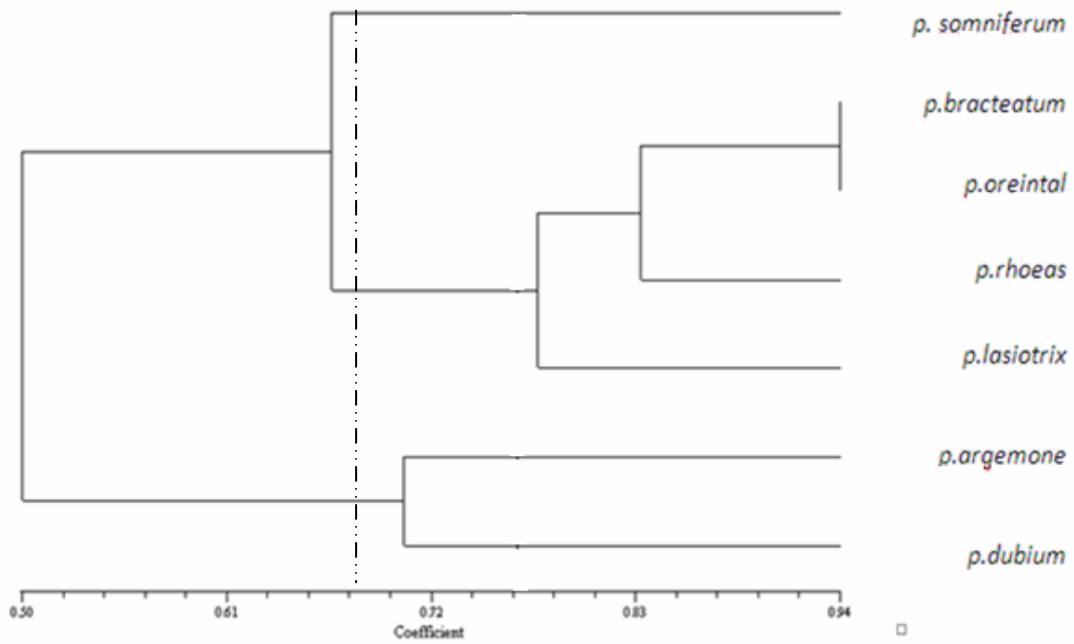


شکل ۱- مقایسه نوارهای پروتئینی حاصل از الکتروفورز پروتئین‌ها به روش

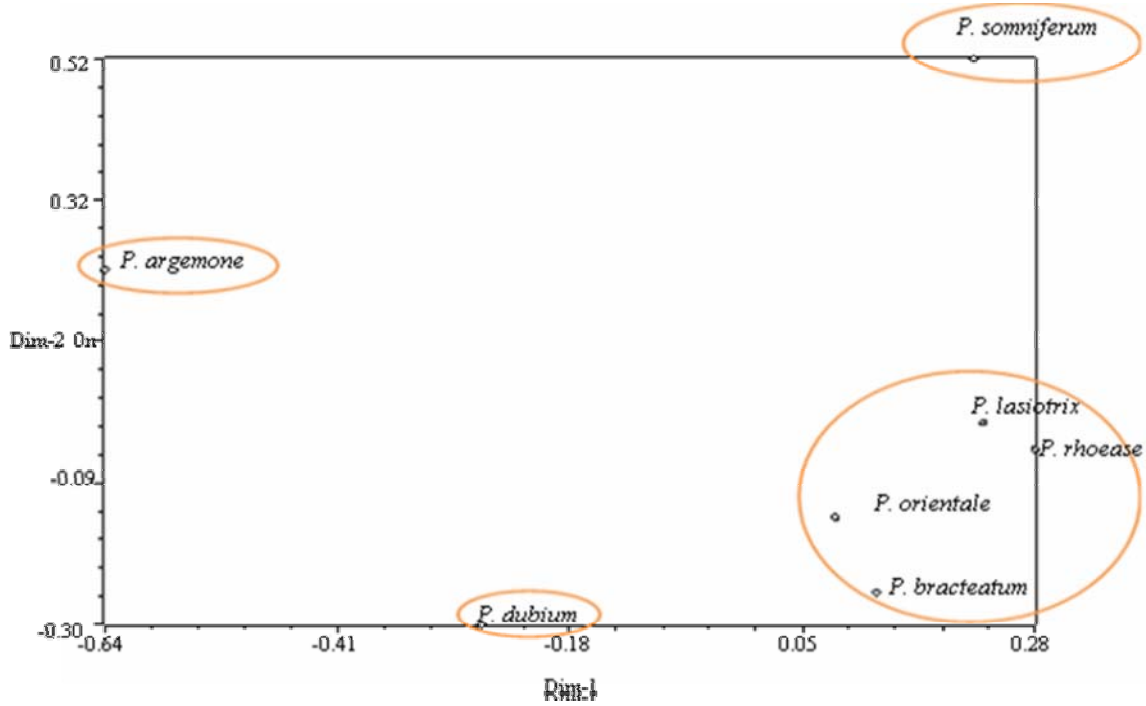
SDS-PAGE در بذر گونه‌های مختلف *Papaver*



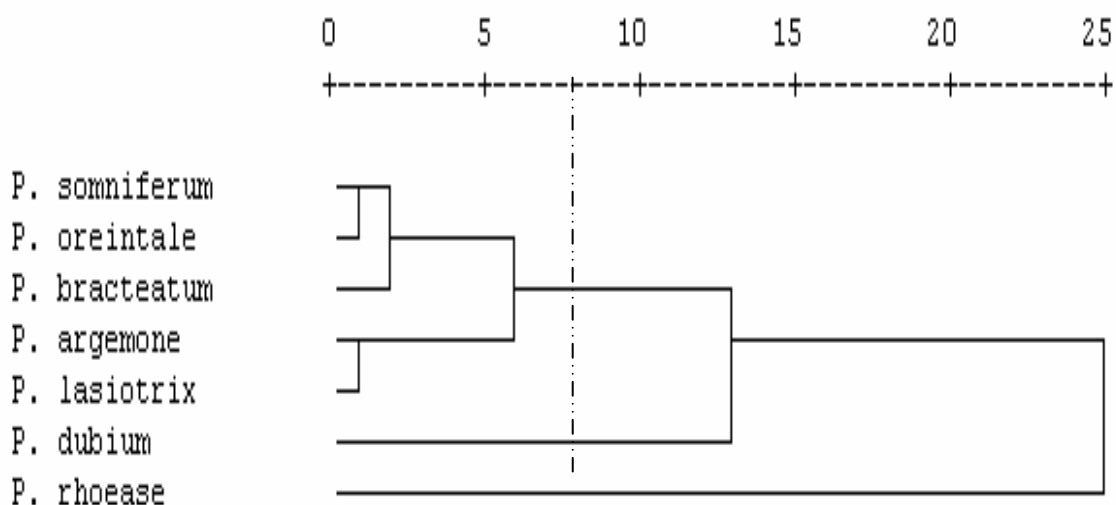
شکل ۲- شکل‌های مختلف بذر گونه‌های مختلف *papaver* مورد مطالعه با بزرگنمایی یکسان



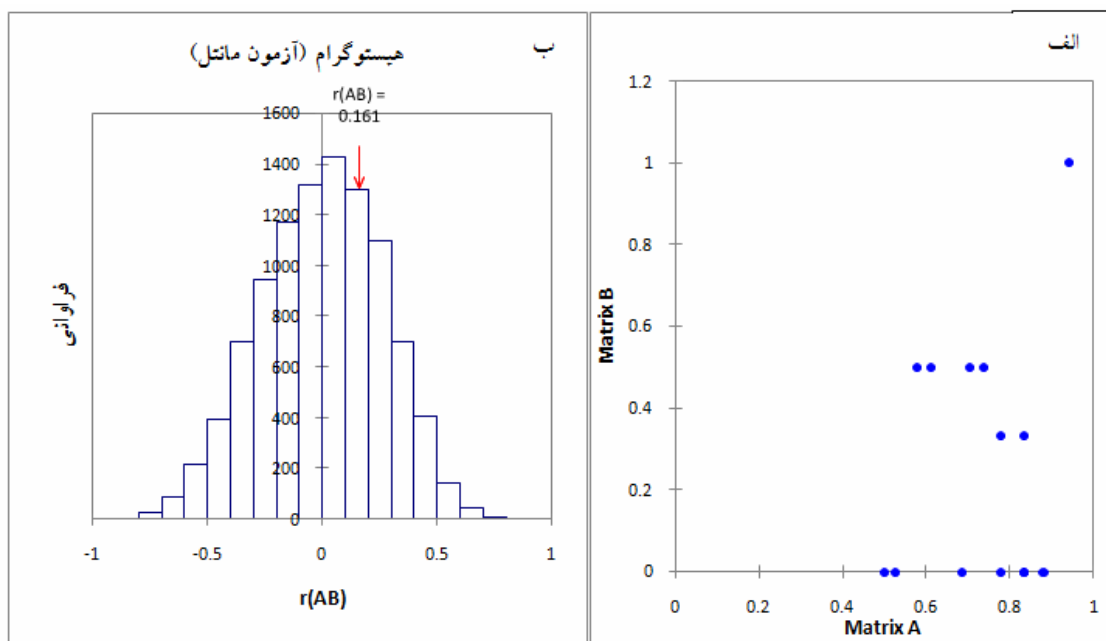
شکل ۳- دندروگرام تجزیه خوشه‌ای براساس تجزیه کامل حاصل از تشابه جاکارد پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر گونه‌های مختلف *Papaver*



شکل ۴- نمودار دو بعدی حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های هم‌هنگ اصلی گونه‌های مختلف *Papaver*



شکل ۵- دندروگرام تجزیه خوشه‌ای به روش وارد و با استفاده از مربع فاصله اقلیدسی حاصل از صفات مورفولوژیک گونه‌های مختلف *Papaver*



شکل ۶- الف) نمایش همبستگی ماتریس‌های حاصل از تشابه جاکارد بین داده‌های مورفولوژیک و پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه، ب) هیستوگرام حاصل از آزمون مانتل بین داده‌های مورفولوژیک و پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه گونه‌های مختلف *Papaver*



شکل ۷- ویژگی‌های مورفولوژیکی (شکل کپسول، شکل و رنگ گل) گونه‌های *Papaver* مورد مطالعه

نشانهگر RAPD همبستگی معنی‌داری را با آزمون مانتل گزارش نکردند. از ماتریس تشابه جاکارد بدست آمده از داده‌های پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه می‌توان در برنامه‌های اصلاحی این گیاه با ارزش سود جست، به‌عنوان مثال تلاقی بین گونه‌های *P. somniferum* با *P. dubium* و *P. argemone* با *P. somniferum* و *P. argemone* با *P. somniferum* (۰/۵۲۶٪ و ۰/۵۲۹٪ تشابه ممکن است به دلیل هتروزیس گونه‌ای تولید شود که دارای آلکالوئیدهای مفید بیشتری به غیر از مورفین باشد که بتوان جایگزین گونه زراعی آن شود.

نداشتن همبستگی معنی‌دار براساس آزمون مانتل بین صفات مورفولوژیک مورد بررسی در این آزمایش با داده‌های مولکولی حاصل از پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه احتمالاً می‌تواند به دلیل تعداد کم صفات مورفولوژیک و کم بودن تعداد نشانهگر مولکولی (کم بودن تعداد باندهای پروتئینی که از معایب مهم نشانهگرهای بیوشیمیایی است) باشد. نداشتن همبستگی معنی‌دار بین دو گروه از ویژگی‌ها مورد نادری نیست. Esmailzadeh Moghaddam و همکاران (۲۰۰۵) در گندم بین داده‌های زراعی با نشانهگر AFLP و Garcia و همکاران (۲۰۰۷) در ۸ جمعیت بومی پاسپالوم در آرژانتین بین داده‌های حاصل از صفات کمی و

- محمدی، س.ا.، ۱۳۸۵. تجزیه و تحلیل داده‌های مولکولی از دیده‌گاه بررسی تنوع ژنتیکی. مقالات کلیدی نهمین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران، ۷-۵ شهریورماه: ۹۶-۱۱۹.
- مصطفائی، ع.، ۱۳۸۳. راهنمای نظری و عملی الکتروفورز پروتئین در ژل. انتشارات یادآور، چاپ دوم، ۱۸۴ صفحه.
- Bara, I., Bara, C., Capraru, G. and Truta, E., 2007. The possible ways of specification in Papaveraceae family. *Analele Științifice ale Universității, Alexandru Ioan Cuza*, Secțiunea Genetică și Biologie Moleculară, Tom VIII: 223-233.
- Boulter, D., Thurman, A. and Turner, B.L., 1966. The use of Disc electrophoresis of plant proteins in systematics. *Taxon*, 15: 135-142.
- Brezinova, B., Macak, M. and Eftimova, J., 2009. The Morphological Diversity of Selected Traits Of World Collection Of Poppy Genotypes (Genus *Papaver*). *Journal of Central European Agriculture*, 2: 183-190.
- Carolan, J.C., Hook, I.L.I., Mark, CH.W., Kadereit, J.W. and Hodkinson, T.R., 2006. Phylogenetics of *Papaver* and Related genera based on DNA sequences from ITS nuclear ribosomal DNA and plastid trnL Intron and trnL-F intergenic spacers. *Annals of Botany*, 98: 141-155.
- Carolan, J.C., Hook, I.L.I., Walsh, J.J. and Hodkinson, T.R., 2002. Using AFLP markers for species differentiation and assessment of genetic variability of in vitro-Cultured *Papaver bracteatum* (section oxytona). *In vitro cellular & developmental biology-Plant*, 38: 300-307.
- Esmailzadeh Moghaddam, M., Thretowan, R.M., William, H.M., Rezai, A., Arzani, A. and Mirlohi, A.F., 2005. Assessment of genetic diversity in bread wheat genotypes for tolerance to drought using AFLPs and agronomic traits. *Euphytica*, 141: 147-156.
- García, M.V., Balatti, P.A. and Arturi, M.J., 2007. Genetic variability in natural populations of *Paspalum dilatatum* Poir. Analyzed by means of morphological traits and molecular markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54: 935-946.
- Goldblatt, P., 1974. Biosystematic studies in *Papaver* section Oxytona. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 61: 264-296.
- Hajduch, M., Ganapathy, A., Stein, J.W. and Thelen, J.J., 2005. A systematic proteomic study of seed filling in soybean. Establishment of high-resolution two-dimensional reference maps, expression profiles, and an interactive proteome database. *Plant Physiology*, 137: 1397-1419.
- Kadereit, J.W., 1993. *Papaveraceae*. 20-33, In: Kubitzki, K., Rohwer, J G. and Bittrich, V. (eds),

نکته مهم دیگری که می‌توان به آن اشاره کرد این است که با توجه به نتایج ماتریس تشابه جاکارد بالایی که از داده‌های پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه بین گونه‌های *P. orientale* و *P. bracteatum* (با تشابه بالای ۰/۹۴) بدست آمد. مطالعات نشان داده است که تلاقی این دو گونه در طبیعت براحتی امکان‌پذیر می‌باشد و بیشتر محققان گونه *Papaver Pseudo- orientale* را با توجه به تعداد کروموزوم‌هایش ($2n=42$) و تلاقی آلپلی‌پلوئیدی حاصل تلاقی این دو گونه می‌دانند (Goldblatt, 1974); (Ojala et al., 1990). نتیجه مهمی که می‌توان از این نکته استنباط کرد این است که تلاقی بین گونه‌ای در جنس *Papaver* براحتی امکان‌پذیر است و کارهای بیشتر اصلاحی روی این جنس، احتمالاً منجر به تولید گونه جدیدی شود که مثلاً آلکالوئیدهایی مانند تبائین و کدئین بالایی تولید کند که داروهای باارزشی در داروسازی می‌باشند.

سپاسگزاری

از جناب آقای دکتر علی مصطفائی، رئیس بخش مطالعات بیولوژی دانشکده داروسازی علوم پزشکی به دلیل راهنمایی‌های ارزنده ایشان و در اختیار قرار دادن آزمایشگاه برای انجام این تحقیق سپاسگزاری می‌شود.

منابع مورد استفاده

- خیامی، م.، حیدری، ر. و ریگزاده، ط.، ۱۳۸۴. رده‌بندی چند رقم کانونا بر مبنای پروتئین کل و ذخیره و اسیدهای چرب دانه. *مجله علوم کشاورزی ایران*، ۳۶(۵): ۱۲۱۴-۱۲۰۷.
- عبدمیثانی، س. و شاه نجات بوشهری، ع.ا.، ۱۳۷۷. اصلاح نباتات. جلد دوم، مؤسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران، ۳۵۲ صفحه.

- Shanker Acharya, H. and Sharma V., 2009. Molecular characterization of Opium Poppy (*Papaver somniferum*) germplasm. American Journal of Infectious Diseases, 5(2): 148-153.
- Srinivas, H. and Narasinga Rho, M.S., 1981. Studies on the proteins of poppy seed (*Papaver somniferum* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 29: 13-25.
- Srinivas, H. and Narasinga Rho, M.S., 1987. Studies on the low molecular weight proteins of Poppy seed (*Papaver somniferum* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 35: 12-14.
- Walker, J.M., 2002. The Protein Protocols Handbook. Humana Press Inc., Totowa, 1146p.
- Weising, K., Nybom, H., Wolff, K. and Kahl, G., 2005. DNA Fingerprinting in Plants Principles, Methods, and Applications Second Edition. Taylor & Francis Group, 444p.
- The Families and Genera of Vascular Plants. Springer-Verlag, 478p.
- Mihalik, E., 1998. Biology of poppy. 1. Taxonomy. 7-47, In: Bernath, J. (ed.), Poppy: the genus *Papaver*. Harwood Academic Publishers, 352p.
- Mohammadi, S.A. and Prasanna, B.M., 2003. Analysis of genetic diversity in crop plants- Salient statistical tools and considerations. Crop Science, 43: 1235-1248.
- Nessler, C.L., 1998. In vitro culture technologies. 209-218, In: Poppy: The Genus *Papaver*. Bernath, J., ed. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands, 352p.
- Ojala, A., Rousi, A., Lewing, E., Pyysalo, H. and Widen, C.j., 1990. Interspecific hybridization in *Papaver* III. F1 hybrids between species of section Oxytona. Hereditas, 112: 221-230.
- Sariyar, G., 2002. Biodiversity in the alkaloids of Turkish *Papaver* Species. Pure and Applied Chemistry, 4: 557-574.

Evaluation of diversity seed storage proteins and some morphological traits in various species of Papaver

R. Ashrafi¹, A. Najaphy^{2*}, M. Shaban¹ and M. Fathi³

1- MSc. Student, Plant Breeding Department, Razi University, Kermanshah, Iran

2*- Corresponding author, Plant Breeding Department, Razi University, Kermanshah, Iran

E-mail: najaphy@yahoo.com

3- Agricultural Support System Company, Ardabil, Iran

Received: November 2010

Revised: May 2011

Accepted: May 2011

Abstract

This experiment was conducted to evaluate the seed storage protein of seven different species of Papaver in Ardabil Province, Iran by SDS-PAGE method. By scoring banding patterns data, a total of 20 loci were identified in the species. Maximum number of protein band (17 bands) was belonged to *P. bracteatum* and *P. rhoease*. Minimum number of protein band (13 bands) was related to the species of *P. argemone* and *P. somniferum*. Cluster analysis based on Jaccard's similarity matrix classified different species in four groups. Different species of papaver were classified as follows: *P. somniferum* in the first group, *P. orientale*, *P. bracteatum*, *P. lasiotrix* and *P. rhoease* in the second group, *P. dubium* in the third group and *P. argemone* in the fourth group. Different species showed a good variety with regard to the morphological traits (petal color and shape, seed color and size and plant height) and the species were classified in three separate groups based upon cluster analysis. Mantel test was performed to examine the correlation of morphological data with seed storage proteins. This test did not show significant correlation between these two groups of data possibly due to the low number of morphological traits and low number of molecular markers.

Key words: Genetic diversity, seed storage proteins, SDS-PAGE, Papaver.