فصلنامه (علمی)

زیست شناسی تکوینی

سال پانزدهم، شماره ۴، پاییز ۱۴۰۲ ص. ۷۳-۶۳

مقاله پژوهشی

ارزیابی تنوع ژنتیکی و روابط فیلوژنتیکی جمعیت‌های کرفس زراعی (*Apium graveolense*) و کرفس کوهی (*Kelussia odoratissima*) به روش SDS-PAGE

اردشیر جودمند[۱]، فاطمه محمودی کردی[۱*]، سارا غفاریان[۱]

[۱] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران.

[*] (نویسنده مسئول مکاتبات): ac.mahmoudi@azruniv.ac.ir

تاریخ دریافت: دی ۱۴۰۱ تاریخ پذیرش: تیر ۱۴۰۲

DOI: 10.30495/jdb.2023.1973660.1341 https:// dorl.net/dor/20.1001.1.2008692.1402.15.4.7.1

چکیده

مطالعه پروتئین‌ها ابزاری مناسب برای برآورد تنوع ژنتیکی و میزان شباهت بین ژنوم‌های مختلف است. با توجه به اهمیت دارویی و غذایی کرفس زراعی و کوه، در این پژوهش تنوع ژنتیکی و روابط فیلوژنتیکی ۱۵ جمعیت کرفس زراعی و شش جمعیت کرفس کوهی بر مبنای پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر کرفس زراعی و کوهی و پروتئین‌های برگ کرفس زراعی در سه مرحله ۳۰، ۴۵ و ۶۰ روز پس از کشت با استفاده از روش SDS-PAGE مورد مطالعه قرار گرفت. حضور و عدم حضور نوار به ترتیب با یک و صفر امتیازدهی و سپس تعداد کل نشانگرهای ایجاد شده، تعداد نشانگرهای چندشکل، درصد چند شکلی نشانگرها، تعداد آلل مشاهده شده، تعداد آلل موثر، متوسط هتروزیگوسیتی، شاخص اطلاعات شانون و شاخص تنوع ژنی نی برآورد شد. همچنین تجزیه واریانس مولکولی، تجزیه به بردارهای اصلی و گروهبندی جمعیت‌ها بر اساس الگوریتم Minimum Evolution و ضریب فاصله P-Distance انجام گرفت. نتایج حاصل از این مطالعه نشان دهنده تنوع ژنتیکی بالا در هر دو جمعیت کرفس کوهی و زراعی، متوسط هتروزیگوسی بالای بذرهای کرفس زراعی در مقایسه با بذرهای کرفس کوهی و تنوع درون جمعیتی در هر دو گیاه در مقایسه با تنوع بین جمعیتی سطح بالاتری داشت. داده‌های این پژوهش نشان داد در کرفس زراعی تنوع ژنتیکی از تنوع جغرافیایی تبعیت نمی کند.

کلیدواژه‌ها: کرفس زراعی، کرفس کوهی، تنوع ژنتیکی، روابط فیلوژنتیکی، SDS-PAGE.

مقدمه

تیره چتریان (Apiaceae)، یکی از بزرگ‌ترین تیره‌های گیاهی با ۳۰۰ جنس و ۳۰۰۰-۲۵۰۰ گونه است. ایران یکی از مراکز اصلی تجمع و پراکنش تیره‌ی چتریان است و حدود ۱۱۴ جنس و ۴۲۰ گونه آن در ایران شناسایی شده که شناسایی آنها فقط دروضعیت میوه دار گیاه امکانپذیر است [۱].

کرفس زراعی(*Apium graveolens* L.)، گیاه علفی چندساله، ازخانواده چتریان، دارای ریشه راست و دوکی شکل با

قابلیت ذخیره مواد غذایی مورد نیاز گیاه برای شروع رشد رویشی مجدد در فصل رشد بعدی است. کرفس به طور گسترده در داروسازی، صنایع غذایی و زینتی استفاده می شود و دارای ارزش تجاری قابل توجهی است. مطالعات مختلف نشان دهنده نقش این گیاه در پیشگیری از بیماری‌های قلبی و عروقی و کاهش قند و چربی خون بوده و اثرات ضد انعقادی، ضد التهابی، ضد باکتریایی و ضد قارچی آن اثبات شده است. همچنین، به دلیل داشتن ترکیباتی مانند اپی ژنین و ویتامین‌های A و C خاصیت آنتی اکسیدانی قوی به آن نسبت داده شده است [۲].

کرفس کوهی با نام جدید *Kelussia odoratissima* Mozaff. و نام قبلی *Apium odoratissima* نام محلی کلوس گونه ای چند ساله، از جنس جدید *Kelussia* و تیره چتریان است [۳]. کرفس کوهی دارای خواص دارویی متنوعی است و مردم محلی از آن به عنوان گیاهی ضد التهاب، ضد درد، آرامبخش، ضد سرفه و ضد دیابت و موثر در درمان دل درد، رماتیسم و تصفیه خون استفاده می‌کنند[۴]. رویشگاه طبیعی این گیاه مرتعی و بومی در ایران ارتفاعات و مناطق برفگیر ناحیه زاگرس مرکزی است [۵،۳].

تنوع ویژگی تمام جمعیت‌های زنده است و اساس هتروزیگوتی و انعطاف پذیری فیزیولوژیکی افراد و تکامل موجودات زنده را فراهم می‌کند [۶]. تنوع ژنتیکی جمعیت‌های گیاهی از طریق ساز و کارهای مختلفی مانند جهش، نوترکیبی، مهاجرت، جریان ژنی، رانش ژنتیکی و ... ایجاد می‌شود [۷]. مطالعات نشان داده است تنوع ژنتیکی بالا در گیاهان تحمل آن‌ها را در مقابل تنش‌های محیطی افزایش داده و قدرت زیست آن‌ها را در طولانی مدت حفظ می‌کند. در برنامه‌های اصلاحی برای تولید ارقام جدید با کیفیت و کمیت بالا و مقاوم به تنش‌های زیستی و غیرزیستی وجود تنوع کافی امری ضروری است [۸]. بنابراین تعیین سطح تنوع ژنتیکی و شناسایی ساختار جمعیت‌های طبیعی گیاهی، اساس استراتژی‌های حفاظت از ذخایر ژنتیکی را تشکیل داده و برای بهره‌برداری اقتصادی و درست از گیاهان ضروری است [۹].

امروزه به دلیل برداشت‌های بدون برنامه، گیاهان دارویی خودرو در خطر تهدید انقراضند بنابراین مطالعه روابط تکاملی و فیلوژنتیکی این گیاهان مسئله مهمی است. با توجه به معایب نشانگرهای مورفولوژیک و تنوع کم نشانگرهای آنزیمی در برآورد تنوع بین جمعیت‌ها، نشانگرهای مولکولی ابزارهایی مناسب و مفید در مطالعات تنوع ژنتیکی و تجزیه ژنوم گیاهان می‌باشند. یکی از روش‌های ارزیابی تنوع ژنتیکی گیاهان و طبقه بندی آنها، الکتروفورز پروتئین‌هاست [۱۰]. این روش از گسترده‌ترین روش‌های توصیف بیوشیمیایی جمعیت‌های گیاهی است. در الکتروفورز پروتئین به روش SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) با از بین رفتن ساختار طبیعی و خنثی شدن بار مولکولی پروتئین‌ها در حضور SDS، تفکیک آن‌ها صرفا بر اساس تفاوت وزن مولکولی است و پرکاربردترین روش الکتروفورز پروتئین‌ها محسوب می‌شود [۱۱].

یکی از انواع پروتئین‌های دارای کاربرد وسیع به عنوان نشانگر، پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه گیاهان است. علت این امر چند شکلی بسیار زیاد، تاثیر پذیری کم از محیط و کنترل ژنتیکی ساده این دسته از پروتئین‌ها است. مطالعه این پروتئین‌ها الگوی مناسبی برای تعیین میزان تنوع درون و بین جمعیتی، شناسایی خویشاوندان وحشی گیاهان، بررسی فرآیند اهلی شدن آنها و تعیین میزان شباهت بین ژنوم‌های مختلف آنها را فراهم می‌کند [۱۲].

تا کنون بررسی‌های زیادی روی ارزیابی تنوع ژنتیکی گیاهان دارویی اهلی و وحشی با استفاده از الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره ای بذر انجام شده است. معصومی و همکاران، تنوع ژنتیکی جمعیت‌های سه گیاه از تیره چتریان *Foeniculum vulgare* ,*Cuminum cyminum*,*Falcaria vulgaris* را بررسی کرده و درصد پلی مورفیسم پایینی را بین جمعیت‌های هر سه گیاه مورد مطالعه گزارش کردند [۱۳]. همچنین تنوع ژنتیکی در گونه‌های نعنا با استفاده از الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره ای دانه ارزیابی شد و الگوی نوار بندی پروتئینی به خوبی تفکیک ژنوتیپ‌ها را انجام داد(۱۴). ضابط و همکاران تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های زیره سبز خراسان را با استفاده از SDS-Page بررسی کردند و درصد پلی مورفیسم پایین گزارش شد ولی گروه بندی اکوتیپ‌ها نشان داد تنوع ژنتیکی از تنوع جغرافیایی پیروی نمی‌کند [۱۵].

با توجه به اهمیت خوراکی، دارویی و اکولوژیکی گیاهان کرفس زراعی و کوهی، بررسی تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌های مختلف این گیاهان می‌تواند در حفاظت بیشتر کرفس کوهی، این میراث اکولوژیک موثر باشد. همچنین استفاده از این اطلاعات در برنامه‌های اصلاحی و دو رگ گیری کرفس زراعی مفید است. باتوجه به این که تاکنون گزارشی در مورد بررسی تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیتی کرفس زراعی و کوهی با استفاده از نشانگرها در ایران ارائه نشده است، این مطالعه با هدف بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مختلف کرفس زراعی و کوهی با استفاده از پروتئین‌های ذخیره ای دانه و برگ انجام شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

به منظور مطالعه تنوع جمعیت‌های کرفس، بذرهای پانزده جمعیت کرفس زراعی و شش جمعیت کرفس کوهی از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر تهیه گردید. به منظور کشت ابتدا بذرها با استفاده از مایع ظرفشویی شستشو، سپس توسط الکل ۷۰ درصد به مدت ۲ دقیقه تیمار و در نهایت ۱۵ دقیقه با محلول هیپوکلریت ۵ درصد استریل شدند. برای جوانه‌زنی بهتر و موثرتر بذرها به مدت یک هفته در دمای $4^{o}C$ در آب مقطر نگهداری و سپس در گلدان‌ها کاشته شدند. با توجه به عدم جوانه‌زنی موفق کرفس کوهی، بذر این گیاه و در کرفس زراعی نمونه‌برداری از بذر و برگ در سه مرحله ۳۰، ۴۵ و ۶۰ روز پس از کشت، برای الکتروفوزر پروتئین‌ها انجام شد.

الکتروفورز پروتئین‌ها

مطالعه الگوی تنوع پروتئین‌های ذخیره ای بذر کرفس زراعی و کوهی و پروتئین‌های برگ کرفس زراعی با استفاده از سیستم الکتروفورزعمودی SDS-PAGE به روش لائملی [۱۶] با اندکی تغییرات انجام گرفت.

استخراج پروتئین از بذر

استخراج پروتئین کل بذر با استفاده از بافر NaCl و Tris انجام گرفت. برای این منظور، ۱۰۰ میلی گرم بذر از هر ژنوتیپ کرفس در هاون چینی آرد شد. ۴۰ میلی گرم از بذرهای آرد شده با یک میلی لیتر محلول استخراج مخلوط شد. پس از ۳ تا ۴ نوبت ورتکس، برای شکسته شدن سلول‌ها، خروج پروتئین‌ها و شکسته شدن ساختار پروتئین‌ها لوله‌ها در فریزرC ۲۰- منجمد و در محیط آزمایشگاه ذوب شد. سپس نمونه‌ها با سرعت rpm ۱۰۰۰۰ به مدت ده دقیقه سانتریفیوژ شده و مایع رویی به تیوپ جدید انتقال یافت. حاصل تا زمان مصرف در یخچال نگهداری شد.

استخراج پروتئین از برگ

برای استخراج پروتئین‌های برگ، ۰/۲ گرم از بافت برگی هر ژنوتیپ کرفس زراعی با استفاده از بافر استخراج در هاون چینی له شد. حاصل به یک لوله اپندورف انتقال و پس از ۲ تا ۳ بار ورتکس به مدت ۱۰الی ۱۵ دقیقه، در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. لوله‌ها پس از رسیدن به دمای آزمایشگاه، به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شدند. مایع رویی به لوله جدید انتقال و در یخچال نگهداری شد.

الکتروفورز

پس از تهیه ژل، پروتئین‌های استخراج شده از یخچال خارج شده و به دمای محیط رسانده شد. ۱۰ میکرولیتر بافر برومونفل و ۲۰ میکرولیتر عصاره استخراج شده از هر نمونه به یک لوله اپندورف منتقل و پس از کمی ورتکس، به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم قرار گرفت. سپس ۳۰ میکرولیتر از هر نمونه در چاهک‌ها بارگذاری و الکتروفورز در جریان ثابت ۵۰ میلی آمپر به مدت ۷-۶ ساعت انجام گرفت. با قطع جریان برق، ژل به مدت ۱۲ ساعت روی همزن درون محلول رنگ آمیزی قرار گرفت. سپس محلول رنگ با مکش خلاء تخلیه، ژل شستشو و به مدت ۸ تا ۱۰ ساعت داخل محلول رنگ بر قرار گرفت. پس از مشخص شدن نوارهای پروتئینی، به‌منظور تثبیت ژل به مدت یک ساعت درون محلول استیک اسید ۷ درصد قرار گرفت. ژل‌ها پس از تثبیت تا زمان عکس برداری داخل آب مقطر و در یخچال نگهداری شدند.

آنالیز داده‌ها

به‌منظور آنالیز آماری، عدم حضور نوار و حضور نوار به ترتیب با صفر و یک امتیازدهی شدند. تعیین درصد چند شکلی نشانگرها

با توجه به تعداد کل نشانگرهای تولیدی و تعداد نشانگرهای چندشکل به صورت دستی انجام گرفت. محاسبه شاخص‌های تنوع ژنتیکی شامل تعداد آلل مشاهده شده (na)، تعداد آلل موثر (ne) و متوسط هتروزیگوسیتی (MH) با استفاده از نرم افزار GenAlex 6.4 [۱۷] انجام گرفت. علاوه بر این تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها با استفاده از شاخص اطلاعات شانون (I) [۱۸] و شاخص تنوع ژنی نی (h) [۱۹] توسط نرم‌افزار PopGen version 1.31 [۲۰] برآورد شد.

برای تعیین کارایی نشانگر مورد بررسی از معیار میزان اطلاعات چند شکلی (PIC) استفاده شد [۲۱]. PIC از رابطه $PIC=1-p_i^2-q_i^2$ محاسبه شد که در آن p_i، فراوانی وجود و q_i، فراوانی عدم وجود نوار خاص بود. کارایی هر نشانگر از میانگین حسابی PIC کلیه نشانگرهای تولید شده محاسبه شد. برای تفکیک واریانس مولکولی کل به واریانس ژنتیکی درون و بین جمعیت‌ها از تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) [۲۲] و نرم‌افزار GenALEx 6.4 [۲۳] استفاده شد. تجزیه به بردارهای اصلی برای تعیین روابط بین ژنوتیپ‌ها با استفاده از نرم افزار GenALEx 6 [۲۴] انجام گرفت.

برای گروه‌بندی جمعیت‌ها ابتدا رابطه بین آن‌ها بر اساس ضریب فاصله نی (۱۹) و با استفاده از نرم‌افزار GenALEx 6 (۲۴) برآورد و سپس ماتریس فاصله برای انجام تجزیه خوشه‌ای به نرم افزار MEGA 4.1 [۲۵] انتقال یافت. در نهایت تجزیه خوشه‌ای بر اساس الگوریتم Minimum Evolution [۲۶] و ضریب فاصله P-Distance [۲۷] انجام گرفت.

نتایج

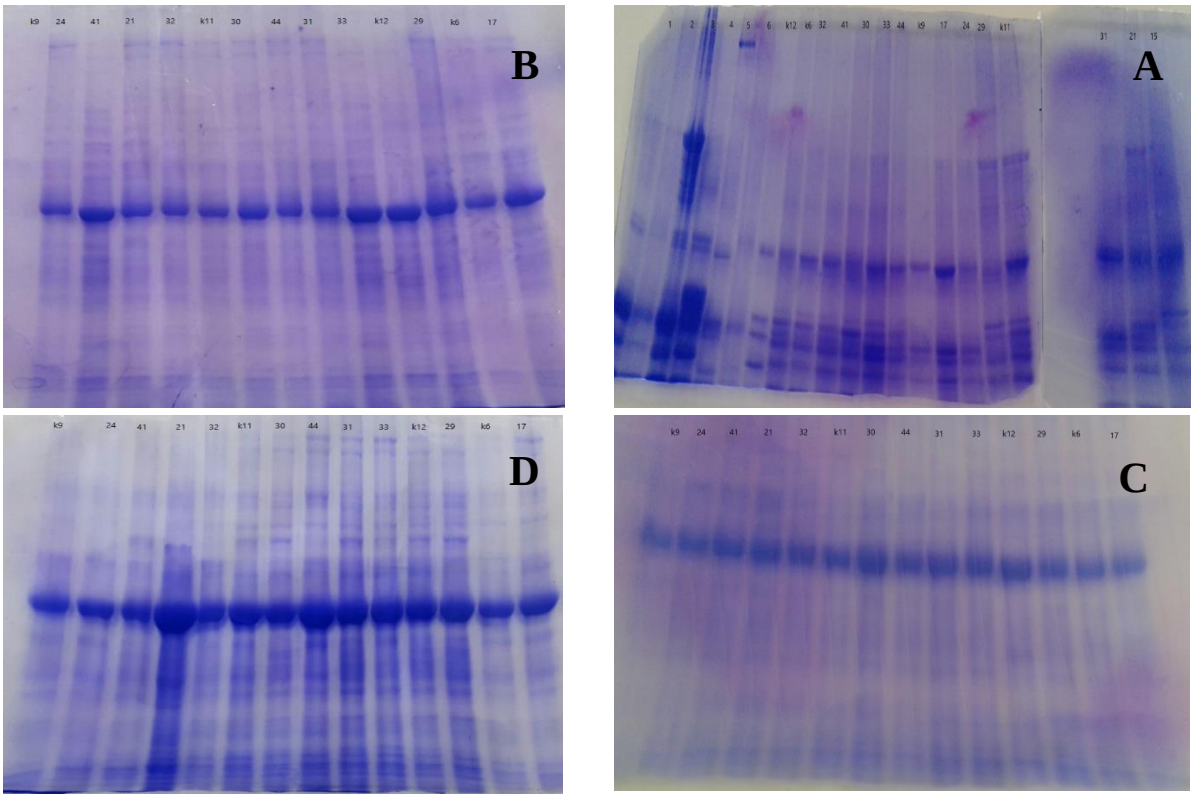
چندشکلی و اطلاعات ژنومی نشانگرها

در این تحقیق الگوی پروتئینی بذر ۲۱ جمعیت کرفس زراعی و کوهی و برگ‌های ۳۰، ۴۵ و ۶۰ روزه‌ی کرفس زراعی برای تعیین تنوع ژنتیکی موجود مورد مطالعه قرار گرفت. به دلیل عدم موفقیت جوانه‌زنی بذر، ژنوتیپ‌های کوهی از مطالعه الگوی پروتئینی برگ کنار گذاشته شدند. در الگوی نوار بندی پروتئین‌های بذر ۲۱ جمعیت مورد مطالعه در مجموع ۸ نوار واضح و قابل تفسیر دیده شد. الگوی نواربندی پروتئین‌های کل در این روش سه ناحیه را نشان داد. از این تعداد چهار نوار شامل پروتئین‌های با وزن مولکولی کم، سه نوار شامل پروتئین‌های با وزن مولکولی متوسط و یک نوار شامل پروتئین‌هایی با وزن مولکولی زیاد بودند. تفاوت‌های بین جمعیت‌ها از نوع کیفی و وجود یا عدم وجود نوارهای پروتئینی و نه شدت رنگ پذیری آنها بود. نتایج پژوهش نشان دهنده تنوع بیشتر پروتئین هایی با وزن مولکولی بالا بود.

در الگوی نواربندی پروتئین‌های برگ‌های ۳۰ روزه، در مجموع ۱۲ نوار واضح و قابل تفسیر مشاهده شد. سه نوار [۲،۸،۱۲] در همه جمعیت‌ها یکسان وجود داشت. ۱۳ نوار واضح و قابل تفسیر در الگوی نواربندی پروتئینی برگ‌های ۴۵ روزه مشاهده شد که هفت نوار [۳،۵،۶،۷،۱۰،۱۲،۱۳] در همه جمعیت‌ها یکسان بودند. همچنین از مجموع ۱۶ نوار واضح و قابل تفسیر مشاهده شده در الگوی نواربندی پروتئین‌های برگ‌های ۶۰ روزه پنج نوار [۷،۹،۱۲،۱۴،۱۶] در همه جمعیت‌ها مشابه بودند (شکل ۱). در مجموع در الگوی پروتئینی برگ‌های ۳۰، ۴۵ و ۶۰ روزه‌ی کرفس زراعی به ترتیب ۷۵، ۴۶ و ۶۸ درصد نوارها چند شکل بودند. کمترین و بیشترین تنوع الگوی پروتئینی جمعیت‌های زراعی به ترتیب مربوط برگ‌های ۴۵ و ۳۰ روزه بود (جدول ۱).

مقادیر شاخص تنوع ژنتیکی (h) در بذر بیشتر از برگ و در کرفس زراعی بیشتر از جمعیت وحشی بود. مقدار این شاخص در برگ‌های ۶۰ روزه ۲/۵ برابر برگ‌های ۴۵ روزه بود. در مرحله ۶۰ روز با وجود کاهش تعداد نوارها تنوع افزایش یافت. مقدار عددی شاخص اطلاعات شانون (I) در بذر بیشتر از برگ و در جمعیت زراعی بیشتر از جمعیت کوهی بود. متوسط هتروزیگوسی در جمعیت کوهی نصف جمعیت زراعی بود اما در برگ‌های ۳۰ روزه بیشتر از برگ‌های ۶۰ روزه بود. کمترین متوسط هتروزیگوسی متعلق به جمعیت ۴ روزه بود.

مقدار متوسط شاخص PIC برای بذر برابر ۰/۲۶۸ بود و در جمعیت‌های زراعی و وحشی به ترتیب ۰/۳۶۳ و ۰/۱۷۵ برآورد شد. همچنین مقدار PIC برای برگ‌های ۳۰، ۴۵ و ۶۰ روزه جمعیت‌های زراعی به ترتیب ۰/۲۶۹، ۰/۱۴۳ و ۰/۲۵۶ بود. کمترین میزان PIC متعلق به برگ‌های ۴۵ روزه بود (جدول ۲). فاصله دو جمعیت وحشی و زراعی بر اساس شاخص تنوع ژنی نی فاصله ژنتیکی Nei، ۰/۳۹۱ برآورد شد.



شکل ۱- الگوی نواربندی پروتئین‌های ذخیره ای دانه (A) و برگ‌های ۳۰ (B)، ٤٥ (C) و ٦٠ روزه (D) با استفاده از SDS-PAGE در جمعیت‌های کرفس زراعی و کرفس کوهی

Figure1: Electrophoretic pattern of cultivated and wild celery seeds (A) and 30 (B), 45 (C) and 60 (D) Day old leaves, using SDS-PAGE

جدول ۱- مشخصات جمعیت‌های مورد مطالعه کرفس زراعی و کوهی

Table1. Charasteristics of studied cultivated and wild celery populations

	Location محل	Genotype ژنوتیپ	Code شماره شناسایی	Code کد		Location محل	Genotype ژنوتیپ	Code شماره شناسایی	Code کد
1	Mianeh	Cultivated	53674	Cult21	12	Qom	Cultivated	53659	CultK6
2	Urmia	Cultivated	53668	Cult15	13	Khorramabad	Cultivated	53685	Cult32
3	Mahabad	Cultivated	53664	Cult11	14	West A.	Cultivated	53694	Cult41
4	Lordegan	Cultivated	53684	Cult31	15	Lordegan	Cultivated	53683	Cult30
5	Lordegan	Cultivated	53682	Cult29	16	Gene bank	Wild		W1
6	Urmia	Cultivated	53667	Cult24	17	Zahedan	Wild		W2
7	Mahabad	Cultivated	53665	CultK12	18	Zahedan	Wild		W3
8		Cultivated	53662	CultK9	19	Esfahan	Wild		W4
9	Urmia	Cultivated	53697	Cult44	20	Gene bank	Wild		W5
10	Borujerd	Cultivated	53686	Cult33	21	Gene bank	Wild		W6
11	Urmia	Cultivated	53670	Cult17					

تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA)

نتایج تجزیه واریانس مولکولی بر اساس الگوی پروتئینی بذر جمعیت‌های وحشی و زراعی در جدول ۳ نشان داده شده است. واریانس‌های بین و درون گروهی در سطح احتمال ۰/۰۱ معنی‌دار بودند و واریانس درون گروهی بیش از بین گروهی برآورد شد. این امر نشان دهنده تنوع ژنتیکی زیاد جمعیت‌های مورد مطالعه و

در نتیجه قابلیت استفاده از این جمعیت‌ها در برنامه‌های اصلاح این گیاه باشد. بررسی الگوی پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر نشان دهنده تنوع بیشتر کرفس زراعی در مقایسه با کرفس کوهی بود.

تجزیه به بردارهای اصلی

برآورد درصد واریانس تبیین شده توسط ۳ بردار اصلی برای نشانگرهای بذر (جدول ۴) نشان داد سه بردار اول در مجموع ۸۳/۷۳ درصد از تغییرات مولکولی کل بین ژنوتیپ‌ها را تبیین می‌کنند که همبستگی بالا با الگوی پروتئینی را نشان می‌دهد.

مجموع مربع انحرافات برای جمعیت‌های وحشی و زراعی به ترتیب ۵/۳۳ و ۱۶/۴ بود که نشان دهنده قابلیت بالای جمعیت‌های زراعی مورد مطالعه جهت استفاده در برنامه‌های اصلاحی است. تنوع کمتر بین جمعیت‌های وحشی می‌تواند ناشی از عدم وقوع رانش و جدایی ژنتیکی بالا بین آنها باشد.

نمودار پراکنش ژنوتیپ‌های کرفس زراعی و وحشی بر اساس دو بردار اول حاصل از تجزیه به بردارهای اصلی با استفاده از داده‌های بذر در شکل ۲ نشان داده شده است. جمعیت‌های وحشی با هم در یک گروه و جمعیت‌های زراعی در گروه دوم جای گرفتند.

پروتئین‌ها فرآورده‌های نهایی اغلب ژن‌ها هستند و تنوع آنها بسیار بیشتر از تنوع پروتئین‌های آنزیمی است، بنابراین احتمال وجود چند شکلی در الگوی نواربندی پروتئین‌های حاصل از الکتروفورز بیشتر است. این تنوع می‌تواند ابزاری برای گروه بندی ارقام و بررسی تنوع ژنتیکی باشد. نتایج پژوهش نشان داد الگوی پروتئینی و به تبع آن گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها در دانه و برگ متفاوت است.

جدول ۲- تعداد نوار تکثیری (N)، تعداد نوار چندشکل (Np)، تعداد نوار اختصاصی (Ns)، تعداد آلل مشاهده شده (na)، تعداد موثر آلل (ne)، تنوع ژنتیکی (h)، شاخص اطلاعات شانون (I)، متوسط هتروزیگوسی (MH)، شاخص قدرت تفکیک نشانگر (PIC) و شاخص نشانگر (MI) بر اساس وجود یا عدم وجود نوار پروتئینی در جمعیت‌های کرفس زراعی و کوهی

Table2. The number of amplified loci (N), The number of polymorphic loci (Np), The number of specific bands (Ns), The number of observed allel (na), The number of effective allel (ne), Genetic diversity (h), Shanon information index (I), Mean heterozygosity (MH), Polymorphic information content (PIC) and Marker index (Mi) based on presence or absence of protein band in cultivated and wild celery genotypes.

Organ		N	Np	Np (%)	Ns	na*	ne*	h*	I*	MH	PIC
Seed	Total					1.687	1.495	0.2777	0.430	0.269	0.286
	Cultivated	8	6	75	1	1.750	1.590	0.324	0.466	0.363	0.362
	Wild	7	5	62.5	0	1.625	1.401	0.230	0.341	0.175	0.175
Leaf	Total					1.750	1.276	0.192	0.312	0.270	0.269
	Cultivated	13	6	46.5	13	1.461	1.174	0.109	0.177	0.144	0.143
	Wild	16	11	68.75	16	0.687	0.439	0.255	0.379	0.257	0.256

* N: The number of amplified loci
* Np: The number of polymorphic loci
* Ns: The number of specific bands
* na: The number of observed allel
* ne: The number of effective allel
* h: Genetic diversity
* I: Shanon information index
* MH: Mean heterozigosity
* PIC: Polymorphic information content
* Mi: Marker index

جدول ۳- تجزیه واریانس مولکولی بر اساس الگوی الکتروفورز پروتئینی بذر

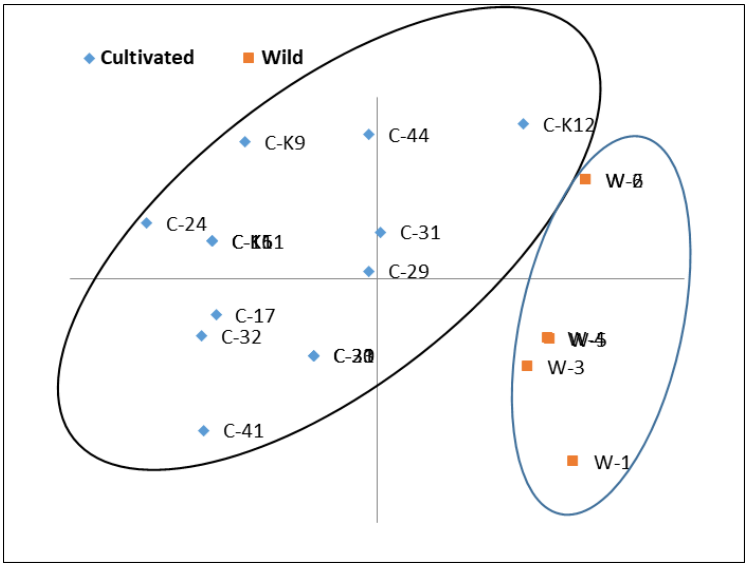
Table 3. Analysis of molecular variance based on seeds protein electrophoresis data

Source of variation منابع تغییر	df درجه آزادی	Sum of square مجموع مربعات	Mean of square میانگین مربعات	Estimation of Variance برآورد واریانس	Percentage of explained variance درصد تبیین واریانس
Between groups بین گروهها	1	8.362	8.362	0.842	42%
Within groups درون گروهها	19	21.733	1.144	1.144	58%
Total کل	20	30.095	0.506	1.986	1

جدول ۴- درصد واریانس تبیین شده به وسیله بردارهای اصلی بر اساس داده‌های حاصل از الکتروفورز پروتئین دانه‌های کرفس

Table4. Explained molecular variance by third first coordinate based on celery seeds protein electrophoresis data

	Coordinate1 بردار اول	Coordinate2 بردار دوم	Coordinate3 بردار سوم
Explained molecular variance درصد واریانس تبیین شده	41.86	26.01	15.86
Total Variance مجموع واریانس‌ها	41.86	67.87	83.73



شکل ۲- نمودار پراکنش جمعیت‌های کرفس بر اساس دو بردار اول حاصل از تجزیه به بردارهای اصلی بر اساس الگوی پروتئینی

Figure 1. Scatter plot of the first and second PCoA coordinates based on the celery genotypes seed electrophoresis data

گروه بندی جمعیت‌ها بر اساس داده‌های الگوی پروتئین‌های ذخیره ای بذر محلول در نمک Tris+NaCl

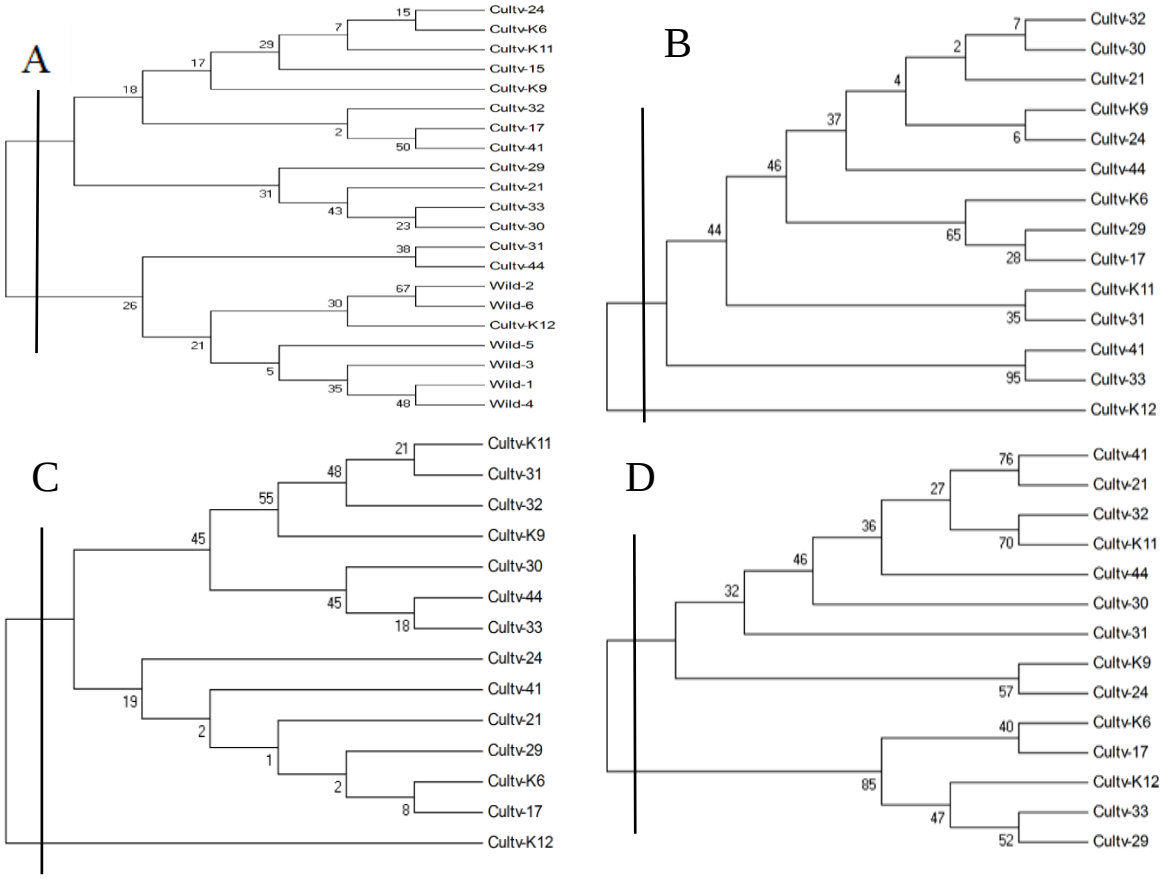
بر اساس این گروه‌بندی، جمعیت‌های مورد مطالعه در دو گروه اصلی جای گرفتند. بطوریکه جمعیت‌های وحشی همراه با سه جمعیت زراعی شماره ۴، ۹ و ۷ به یک گروه و مابقی جمعیت‌های کرفس زراعی به گروه دوم منتسب شدند. در گروه جمعیت‌های زراعی دو زیرگروه قابل تشخیص بود. تفکیک جمعیت‌ها با خصوصیات ریختی بذر و وحشی یا زراعی بودن جمعیت همبستگی داشت. بطوریکه جمعیت‌های کرفس کوهی با بذرهای با اندازه بزرگ و شکل متفاوت با بذر زراعی در گروه اول و جمعیت‌های زراعی با بذرهایی کوچک در گروه دوم جای گرفتند (شکل ۳ -A).

گروه بندی جمعیت‌ها بر اساس داده‌های الگوی پروتئینی برگ محلول در نمک Tris+NaCl محتوی ساکارز

گروه‌بندی جمعیت‌ها بر اساس داده‌های الگوی پروتئینی برگ ۳۰ روزه کرفس زراعی، آن‌ها را در سه دسته عمده و مجزا قرار داد. به این ترتیب که جمعیت شماره ۷ به تنهایی در یک گروه مجزا و دو جمعیت ۱۰ و ۱۴ با هم در یک گروه قرار گرفتند. مابقی جمعیت‌ها به گروه سوم منتسب شدند. بطوریکه جمعیت‌های ۱، ۶، ۸، ۱۳ و ۱۵ با هم در یک گروه جای گرفتند (شکل ۳، B). بر اساس گروه بندی ۱۴ جمعیت زراعی بر اساس داده‌های الگوی پروتئین‌های برگ ۴۵ روزه، تمامی جمعیت‌ها غیر از جمعیت شماره ۷ از مهاباد در یک گروه قرار گرفتند. در گروه دوم، دو زیر جمعیت شناسایی شد (شکل ۳، C). ۱۴ جمعیت زراعی مورد مطالعه بر اساس داده‌های الگوی پروتئین‌های برگ ۶۰ روزه دو گروه جای گرفتند. دسته اول شامل جمعیت‌های شماره ۱، ۳، ۴، ۶، ۸، ۹، ۱۳، ۱۴ و ۱۵ می باشد. در دسته دوم جمعیت‌های شماره ۲، ۵، ۷، ۱۰، ۱۱ و ۱۲ قرار گرفتند (شکل ۳، D).

بحث

در این پژوهش جمعیت‌های زراعی اصلاح شده گیاه کرفس الگوی نوار بندی متنوع‌تری نسبت به جمعیت‌های کرفس کوهی از خود نشان دادند. به‌طوری که دو نوار پروتئینی اصلی مشاهده شده در جمعیت‌های زراعی در جمعیت‌های کرفس کوهی مشاهده نشد. در مطالعه انجام شده توسط Asghar و همکاران [۲۸] به منظور بررسی تنوع ژنتیکی، توزیع جغرافیایی و ارتباط آن با الگوی نوار بندی پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر ۲۹ جمعیت نخود با روش الکتروفورز SDS-PAEG، نتایج حاصل نشان دهنده تعداد نوار پروتئینی کمتری در ارقام بومی و گونه‌های وحشی در مقایسه با جمعیت‌های اصلاح شده بود، بطوری که با وجود سه



شکل ۳- گروه‌بندی جمعیت‌های کرفس زراعی بر اساس داده‌های الگوی پروتئینی بذر (A)، برگ‌های ۳۰ (B)، ۴۵ (C) و ۶۰ (D) روزه، با استفاده از الگوریتم Minimum Evolution و ضریب فاصله P-distance

Figure 3. Dendrograms depicting genetic relationships among cultivated celery populations based on seed (A), and 30 (B), 45 (C) and 60 (D) days old leaves protein electrophoresis data using Minimum Evolution algorithm and P-distance distance coefficient.

نوار اصلی و نوارهای فرعی در همه ارقام اصلاح شده و کشت شده متعلق به نواحی مختلف جغرافیایی، این نوارها در ارقام بومی مشاهده نشد. همچنین نتایج بررسی تنوع ژنتیکی در گونه‌های مختلف نعنا هم تفاوت در وجود برخی از باندهای پروتئینی در گونه زراعی را نشان داد که در گونه‌های وحشی مشاهده نشد [۱۴].

شاخص تنوع ژنتیکی (h)، در جمعیت‌های وحشی کمتر از جمعیت‌های زراعی بود. تنوع کمتر از نظر شاخص تنوع ژنتیکی (h)، می‌تواند ناشی از وجود ساز و کارهای مختلفی مانند جهش، نوترکیبی، مهاجرت، جریان ژنی، رانش ژنتیکی و ... بین جمعیت‌های طبیعی باشد [۲۹]. همچنین بر اساس نتایج تجزیه واریانس مولکولی، واریانس درون گروهی بیش از واریانس بین گروهی بود. وجود تنوع بین گروهی کم و تنوع درون گروهی بالا می‌تواند ناشی از جریان ژنی از محل اشتقاق گونه‌ها و روش تکثیر آنها باشد. در واقع نحوه تولید مثل و سیستم‌های اصلاحی می‌توانند تاثیر معنی‌دار روی تنوع ژنتیکی و پراکنش آن داشته باشند [۳۰]. تفاوت بین جمعیت‌ها می‌تواند بر اساس عواملی مثل رانش ژنتیکی و جدایی ژنتیکی جمعیت‌ها توجیه شود. کم بودن تنوع بین جمعیتی و شاخص‌های تمایز، نشان دهنده وجود جریان ژنی بالا در بین جمیت‌ها است [۳۱].

در موارد متعددی از پروتئین‌های ذخیره بذر در بررسی تنوع درون و بین گونه‌ای، مطالعات سیستماتیك و کمك به رده بندی‌های جدید استفاده [۳۲، ۳۳] و نشان داده شده است که الگوی نوارهای پروتئینی می‌تواند ابزار سودمندی در تشخیص تنوع درون گونه‌ای باشد که با نتایج پژوهش حاضر همسویی دارد. علت عمده تفاوت الگوی پروتئینی و به تبع آن گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها در دانه و برگ می‌تواند مربوط به تفاوت بیان ژن‌ها در بافت‌ها و اندام‌های مختلف و مراحل مختلف رشد و نمو آنها باشد [۳۴].

در این مطالعه بر اساس الگوی نواربندی پروتئین‌های بذر جمعیت‌های کرفس زراعی و کرفس کوهی به خوبی از هم تفکیک شدند، اما همبستگی ضعیفی بین گروهبندی‌های انجام شده با پراکنش جغرافیای وجود داشت. دگرباروری کرفس، جابجایی فیزیکی ژرم‌پلاسم توسط افراد یا جانوران و هتروزیگوسیتی بالا در نتیجه دگرباروری از دلایل عدم مطابقت گروه بندی تجزیه کلاستر با منطقه جغرافیایی می‌باشند. تنوع بالا در جمعیت‌های مختلف و همچنین عدم ارتباط بین تنوع جغرافیایی و مولکولی در مطالعات مختلف گزارش شده است. کیانی و همکاران [۳۵] در بررسی تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های مختلف گل محمدی ارتباط گروه بندی جمعیت‌ها با پراکنش جغرافیایی آنها را ضعیف گزارش نمودند. همچنین گروه‌بندی جمعیت‌های کنجد ارتباط ضعیفی بین پراکنش جغرافیایی و گروه بندی حاصل از مطالعات ژنتیکی نشان داد [۳۶].

هدف عمده تجزیه خوشه‌ای در به‌نژادی گیاهان زراعی، دسته‌بندی ژنوتیپ‌ها و شناسایی فاصله جمعیت‌ها به‌منظور استفاده از تنوع ژنتیکی موجود در برنامه‌های به‌نژادی گیاهان است [۳۷]. در این پژوهش، تنوع ژنتیکی بالایی در جمعیت‌های زراعی در مقایسه با جمعیت‌های کوهی مشاهده شد. وجود تنوع ژنتیکی بالا درون جمعیت، نتیجه تبادل ژنتیکی ژنوتیپ‌های متفاوت با یکدیگر است و یك مزیت تکاملی برای گونه در شرایط محیطی بی ثبات فراهم می‌کند. این مسئله در مطالعات تکاملی تعیین ارتباط گونه‌های مختلف یك جنس اثبات شده است [۳۸]. تنوع درون جمعیتی قابل توجه درون جمعیت‌های زراعی نشان دهنده قابلیت این جمعیت‌ها برای فرآیندهای اصلاحی بیشتر در جهت افزایش کیفیت و کمیت محصول تولیدی است.

منابع

[1] Mozaffarian V. Umbelliferae. In: Assadi M, Khatamsaz M, Maasoumi AA (editors), Flora of Iran, No. 54. Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, Iran. 2007; 596 pp.

[2] Kooti W, Ali-Akbari S, Asadi-Samani M, Ghadery H and Ashtary-Larky D. A review on medicinal plant of Apium graveolens. Adv Herb Med. 2015; 1: 48-59.

[3] Ahmadi kh, Omidi H, Amini M, Naghdi H, A review on the botanical, phytochemical and pharmacological charachteristics of *Kelussia odoratisima* Mozaff. J. Med. Plants. 2019; 18:30-45.

[4] Ghasemi Pirbalouti A. Medicinal plants used in Chaharmahal and Bakhtyari districts, Iran. Herba Polonica. 2009; 55: 69-75.

[5] Gauri M, Ali SJ and Khan MS. A Review of Apium graveolens (Karafs) with special reference to Unani Medicine. Int Arch Intern Med. 2015; 2: 131-136.
[6] Irvani m and Jabralansar Z. Wild celery, an endangered plant species in the Central Zagros region. United Nations Educational and Promotional Journal, Faculty of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan Department of Natural Resources, Isfahan, Iran 2005. In Persian
[7] Rao NK. Plant genetic resources: Advancing conservation and use through biotechnology. Afr J biotechnol. 2004; 3: 136-145.
[8] Rao SA. Conservation of plant genetic resources. In: Bahar AS and Samiullah k. (editors). Plant breeding advances and in vitro culture. CBS Publishers and Distributers, Delhi, India. 1997.
[9] Korzun V. Molecular markers and their application in cereals breeding. In: Marker Assited Selection: A fast track to increase genetic gain in plant and animal breeding? Session I: MAS in plants. Global Lead Scientific Affairs, Einbeck, Germany. 2003.
[10] Morden CW. and Loeffler W. Fragmentation and differentiation among subpopulations of the endangered Hawaiian mint Haplostachys haplostachya (Lamiaceae). Mol Ecol. 1999; 8: 617-625.
[11] Joshi SP, Ranjekar PK and Gupta, VS. Molecular markers in plant genome analysis. Curr Sci. 1999; 77: 230-240.
[12] Ninfa AJ, Ballou N, David PB and Marilee B. Fundamental laboratory Approaches for Biochemistry and Biotechnology. Wiley. United States. New York, USA. 2010.
[13] Masoumi SM, Kahrizi D, Rostami H, Kiani S, J Soorni, Genetic diversity study of some medicinal plant accessions belong to Apiaceae family based on seed storage proteins pattern. Mol Biol Rep. 2012; DOI 10.1007/s11033-012-1914-3, published online.
[14] Afkar S, Zand R, Genetic Relationships of Some Mint Species Using Seed Storage Protein Pattern, J Genet Resour 2020; 6(1): 12-19.
[15] Zabet M, Rahimi A, Izanloo A and Alizadeh Z, The study of genetic diversity of cumin ecotypes of Khorasan provinces using protein markers. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research 2018; 26, 1:292-301.
[16] Gepts P, Llaca V, Nodari RO and Panella L. Analysis of Seed Proteins, Isozymes, and RFLPs for Genetic and Evolutionary Studies in Phaseolus. In: Linskens HF and Jackson JF (editors), Modern methods of plant analysis: Seed analysis. Springer, Berlin. 1992.
[17] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Naturel 1970; 227: 680-685.
[18] Peakall R and Smouse PE. GENALEX 6.4: Genetic analysis in Excel: Population genetic software for teaching and research. Mol Ecol Notes. 2010; 6: 288-295.
[19] Zhu J, Gale MD, Quarrie S, Jackson MT and Bryan GJ. AFLP markers for the study of rice biodiversity. Theor Appl Genet. 1998; 96: 602-611.
[20] Nei M. Analysis of gene diversity in suddivided populations. PNAS. 1973; 70: 3321-3323.
[21] Yeh FC, Yang RC, Boyle TBJ, Ye ZH and Mao JX. POPGENE, the user-friendly sharewarefor population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Canada. 1997.
[22] Excoffier L, Smouse PE and Quattro JM. Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction sites. Genetics. 1992; 131: 479-491
[23] Peakall R and Smouse PE, GENALEX 6.4: genetic analysis in Excel: population genetic software for teaching and research. Mol Ecol Notes. 2010; 6: 288-295.
[24] Peakall R and Smouse PE. GENALEX 6: genetic analysis in Excel: population genetic software for teaching and research. Mol Ecol Notes. 2006; 6: 288-295.
[25] Tamura K, Dudley J, Nei M and Kumar S. MEGA 4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software, version 4.0. Mol Biol Evol. 2007; 24: 1596-1599.

[26] Rzhetsky A and Nei M. Theoretical foundation of the minimum-evolution method of phylogenetic inference. Mol Biol Evol. 1993; 10: 1073-1095.
[27] Tamura K and Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Mol Biol Evol. 1993; 10: 512-526 .
[28] Asghar R, Siddique T and Afzal, M. Inter and intra-specific variation in SDS-PAGE electrophoregrams of total seed protein in chickpea (*Cicer arietinum* L.) germplasm. Pak J Biol Sci. 2003; 6: 1991-1995.
[29] Rao SA. Conservation of plant genetic resources. In: Bahar AS. and Samiullah k. (editors), Plant breeding advances and in vitro culture. CBS Publishers and Distributers, Delhi, India. 1997.
[30] Donofrio C, Giordani T, Cavallini A, Delorenzis G, Natali L and Scalabrelli G. Retrotransposon-based molecular markers for grapevine species and cultivars identification. Tree Genet Genomes. 2010; 6: 451-466.
[31] Piñera JA, Blanco G, Vázquez E and Sánchez JA. Genetic diversity of blackspot seabream (*Pagellus bogaraveo*) populations ov Spanish coasts: A preliminary study. Mar Biol. 2007; 151: 2153-2158 .
[32] Vural C. A new combination in Descurainia (Brassicaceae) from Turkey. Ann Bot Fenn. 2009; 46: 65-66.
[33] Sheidai M, Saeidi S and Atri M. Taxonomic applications of seed proteins in the genus Bromus L. (Poaceae). Iran J Bot. 2008; 14: 126-131.
[34] Ghaffarian S and Mohammadi, SA. Quantitative gene expression pattern analysis of Na+ Transporter in barley under salinity stress. Genet Eng Biosafe J. 2016; 6: 105-116. In Persian
[35] Kiani M, Zamani Z, Khalighi A, Fatahi R and Byrne DH. Wide genetic diversity of Rosa damascene Mill. Germplasm in Iran as revealed by RAPD analysis. Sci Hortic. 2008; 115: 386-392.
[36] Pezhmanmehr M, Dastan D, Ebrahimi SN and Hadian J. Essential oil constituents of leaves and fruits of Myrtus communis L. from Iran. J Essent Oil-Bear Pl. 2010; 13: 123-129.
[37] Torkamani MD and Karapetion J. An investigation of seed protein content and variation in ten sesame varieties (*Sesamum indicum* L.). J Sci Techn Agr Nat Resour. 2007; 11: 225-231.
[38] Mirali N, El-Khouri S and Rizq F. Genetic diversity and relationships in some Vicia species as determined by SDS-PAGE of seed proteins. Biologia Plantarum. 2007; 51: 660-666.

Assessment of genetic diversity and phylogenetic relationship among some of cultivated and wild celery genotypes based on SDS-PAGE

Joodmand A.[1], Mahmoodi kordi F.[1*], Ghaffarian S.[1]

[1] Department of Biology, Faculty of Sciences, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran.

* (Corresponding author): ac.mahmoudi@azruniv.ac.ir

DOI: 10.30495/jdb.2023.1973660.1341 https:// dorl.net/dor/20.1001.1.2008692.1402.15.4.7.1

Received: December.2023 Accepted: June.2023

Abstract

The study of proteins is an appreciate model for assessment genetic diversity and similarity between different genomes. Considering to the medicinal and nutritional importance of *Apium graveolens* and *Kelussia odoratissima*, in this study genetic relationships and diversity of 6 Kelussia genotypes based on seed proteins and 15 *celery* based on proteins of seeds and leaves 30, 45 and 60 days after germination were studied by SDS-PAGE. Presence and absence of the protein bands were scored as one and zero, respectively. The total number of bands, number of polymorphic bands, the percentage of polymorphic bands, number of indivisual bands, number of alleles, number of effective alleles, genetic diversity, mean of heterozygosity, polymorphic information content and Nei gene diversity index were estimated. Also analysis of molecular variance, analysis of molecular variance to two first coordinates and grouping of populations based on minimum evolution algorithm and P-distance were done. Results showed high genetic diversity in both populations but higher heterozygosity and within population diversity in celery seed compare to Kelussia. Grouping of populations separated celery and Kelussia populations. Agreement of populations grouping with geographic dispersion was more strong in seeds than leaves.

Keywords: Celery, Kelussia, Genetic diversity, Phylogenetic**,** SDS-PAGE.