بررسی الگوی پروتئینی ژنوتیپ‌های کلزا تحت شرایط نرمال و تنش خشکی

Study of Protein Pattern in *Brassica napus* Genotypes under non-stress and Drought Stress Conditions

مهدی کاکایی[۱]*، علی‌رضا زبرجدی [۲]، علی مصطفایی [۳]

چکیده

یکی از روش‌های بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های گیاهی، استفاده از روش الکتروفورز پروتئین می‌باشد. به‌منظور بررسی الگوی پروتئینی کلزا، ۱۶ ژنوتیپ در سه تکرار تحت شرایط تنش خشکی و بدون تنش خشکی در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی ارزیابی شد. در مرحله گلدهی کامل در هر دو شرایط رشدی پروتئین کل نمونه‌های برگی استخراج گردید. هم‌چنین تفکیک پروتئین ذخیره‌ای برگ بر اساس روش لاملی و با استفاده از سیستم الکتروفورز ژل پلی‌اکریل‌آمید در حضور سدیم دو دسیل سولفات در ژل جدا کننده ۱۲/۵ درصد و ژل متراکم کننده پنج درصد انجام پذیرفت. در هر دو محیط (شرایط نرمال و تنش خشکی) میانگین برآورد فاصله ژنتیکی به‌ترتیب در محدوده ۰/۰۵۶ تا ۰/۶۳۲ و ۰ تا ۰/۵بود. ژنوتیپ‌های مورد بررسی بر اساس الگوی پروتئینی و بر اساس ضریب تشابه جاکارد، در شرایط شاهد در سه گروه دسته‌بندی و در شرایط تنش نیز در سه گروه قرار گرفتند (در گروه‌ها ژنوتیپ‌ها به‌طور کامل یکسان نبودند) و نتایج SDS-PAGE تفاوت الگوی باندی بین ژنوتیپ‌ها را تا حدودی مشخص کرد. بر اساس یافته‌های این تحقیق الگوی باندی و به تبع آن گروه بندی ژنوتیپ‌ها در دو شرایط تنش خشکی و نرمال متفاوت است.

واژه‌های کلیدی: کلزا، تنوع ژنتیکی، الکتروفورز ناپیوسته، تجزیه خوشه‌ای

۱. گروه علمی مهندسی کشاورزی (اصلاح نباتات و ژنتیک)، دانشگاه پیام نور، تهران

۲. استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات و عضو پژوهشکده بیوتکنولوژی مقاومت به تنش‌های محیطی، دانشگاه رازی.

۳. استاد مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه.

*: نویسنده مسئول

مقدمه

در دنیا کلزا دومین محصول دانه روغنی بعد از سویا می‌باشد (Hasan *et al*., 2006). یکی از مهم‌ترین پیش نیازهای انتخاب والدین در اصلاح گیاهان، وجود تنوع ژنتیکی معنی‌دار می‌باشد. تنوع ژنتیکی اساس اصلاح گیاهان محسوب می‌شود. تنش‌های محیطی هم‌چون خشکی و شوری مهم‌ترین عامل‌های محدود کننده رشد و تولید محصول در گیاه هستند که موجب مختل شدن تعادل آب درون سلولی می‌شوند (Siddiqui *et al*., 2008).

الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید جهت تعیین وزن ملکولی پروتئین‌ها، روشی رایج و مهم در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی می‌باشد. این روش ضمن ساده بودن به مقدار کمی نمونه برای انجام آزمایش نیاز دارد و دارای قدرت تفکیک مناسب برای شناسایی و تعیین خلوص پروتئین‌هاست. *کاکایی* و *مصطفایی* (Kakaei & Mostafaie, 2010) با الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید در حضور سدیم دو دسیل سولفات (SDS-PAGE) تنوع الگوی پروتئین بذری نخود را بررسی کردند و گزارش کردند که این روش می‌تواند به‌عنوان روشی ساده و اقتصادی جهت شناسایی تنوع ژنتیکی در ژرم پلاسم‌ها مورد استفاده قرار گیرد.

جاوید و همکاران (Javaid *et al*., 2004) در مطالعه ۱۵۱ گونه بادام زمینی با استفاده از SDS-PAGE پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر، آن‌ها را در ۲ گروه قرار دادند.

احمدی موسوی و *منوچهری کلانتری* (Ahmadi mosavi & Manochehri kalantari 2006) در مطالعه اثر ۲۴- اپی براسینولید بر جوانه‌زنی بذر، رشد گیاهچه و پارامترهای بیوشیمیایی کلزا (*Brassica napus* L.) تحت تنش کم آبی گزارش کردند که مقایسه باندهای پروتئینی حاصل از الکتروفورز پروتئین برگ‌های کلزا تحت تیمارهای کم آبی موجب ایجاد تفاوت‌هایی در باندهای الکتروفورزی نسبت به گیاهچه‌های شاهد شده و چندین پروتئین با وزن ملکولی در محدوده ۱۹، ۲۱، ۳۱، ۳۵، ۸۲ و ۱۰۲ دالتون تحت تنش کم آبی افزایش یافته‌اند. *خیامی* و همکاران (Khayami *et al*., 2005) برخی از ژنوتیپ‌های کلزا را از نظر الگوی باندی پروتئین بذر مورد مطالعه قرار داده و آن‌ها را در چهار کلاستر گروه‌بندی کردند.

فارغی و همکاران (Fareghi *et al*., 2005) در ارزیابی ۱۸ ژنوتیپ یونجه با استفاده از روش SDS-PAGE، ۶۱ باند مشاهده کردند و ژنوتیپ‌ها بر اساس نشانگر پروتئینی در سه گروه دسته‌بندی شدند هم‌چنین ضرایب تشابه جاکارد مربوط به الکتروفورز پروتئین‌های بذر و برگ را مطالعه کردند که این ضرایب نتایج تجزیه خوشه‌ای را تایید کردند.

فیروزی و همکاران (Ferozi *et al*., 2010)، در مطالعه بذر ۱۸ ژنوتیپ پنبه به کمک روش (SDS-PAGE) گزارش کردندکه در مجموع برای ارقام مورد مطالعه ۱۶ نوار پروتئینی وجود دارد. *دینی ترکمانی* و *کاراپتیان* (Dini Torkamani & Karapetion 2007) در مطالعه بررسی میزان و تنوع پروتئین در بذر ده رقم کنجد، ژنوتیپ‌ها را از نظر میزان پروتئین در سه گروه و از نظر حذف الگوی باندی الکتروفورزی (SDS-PAGE) تنوعی مشاهده نکردند. پژوهش‌گران مختلف به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی و گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها در کلزا از بررسی‌های پروتئینی بهره گرفته‌اند. این محققین الگوهای پروتئینی به‌دست آمده را مبنای تجزیه خوشه‌ای قرار داده و تنوع بین ژنوتیپ‌ها را مطالعه نموده‌اند و از این لحاظ با پژوهش حاضر مطابقت دارند (Khayami *et al*., 2005; Ahmadi mosavi & Manochehri, 2006; Javaid *et al*., 2004; Kakaei & Mostafaie, 2010).

هدف از این مطالعه بررسی تغییرات الگوی پروتئین‌های برگ ژنوتیپ‌های کلزا در دو شرایط تنش خشکی و بدون تنش در مرحله گلدهی کامل و مشاهده تنوع بین ژنوتیپ‌ها در این دو شرایط به روش SDS-PAGE برگ کلزا می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

جهت این مطالعه ۱۶ ژنوتیپ کلزای پاییزه از موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه شد (جدول ۱). آزمایش در سال زراعی ۸۷-۱۳۸۶ در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۳ تکرار، در دو شرایط با آبیاری (شاهد، ۴ دور آبیاری: ۱) مرحله بلافاصله پس از کشت، ۲) مرحله غنچه‌دهی، ۳) مرحله انتهای مرحله گل‌دهی و ۴) مرحله رشد کامل نیام‌ها) و بدون آبیاری (شرایط تنش خشکی، درمرحله قبل از گل‌دهی آبیاری حذف گردید) در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه رازی با اقلیم نیمه خشک سرد تا معتدل کشت گردید. هر کرت شامل ۵ خط ۳ متری به فاصله ۳۰ سانتی‌متر و فاصله کرت‌ها از هم ۶۰ سانتی‌متر بود. بررسی الگوی الکتروفورزی مواد در آزمایشگاه الکتروفورز پروتئین مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه انجام گرفت.

جدول ۱: ژنوتیپ‌های کلزا مورد استفاده برای تعیین الگوی پروتئینی تحت شرایط تنش خشکی و بدون تنش
Table 1: Rapeseed genotypes used to determine the protein pattern under drought stress and non-stress condition

G1 Licord	G2 Milena	G3 Sahara	G4 Celecious	G5 Sunday	G6 Talaye	G7 Shiralee	G8 Dante
G9 ARC-2	G10 ARC-5	G11 SLM-046	G12 Gernimo	G13 Zarfam	G14 Talent	G15 Rainbow	G16 Opera

استخراج پروتئین برگ در مرحله گل‌دهی کامل

به‌منظور استخراج پروتئین‌های کل برگ، برگ‌ها در مرحله گلدهی کامل در هر دو شرایط تنش خشکی و بدون تنش خشکی از مزرعه جمع‌آوری، و بلافاصله در ازت مایع منجمد گردید و تا زمان استخراج در فریزر ۷۰°C- قرار گرفت. در هنگام استخراج ابتدا برگ‌ها در هاون چینی قرار گرفته در یخ به کمک ازت (نیتروژن) مایع به اندازه کافی پودر گردید و سپس از پودر برگ به‌دست آمده برای استخراج پروتئین استفاده شد. برای این منظور ۲۰ میلی‌گرم از پودر به‌دست آمده از برگ هر رقم با ۲ میلی‌لیتر بافر استخراج (حاوی تریس ۵۰ میلی‌مولار با pH ۸/۵ حاوی EDTA[1], ۱ میلی‌مولار، PMSF[2] ۱ میلی‌مولار، MgCl2 ۲۰ میلی-مولار، ۰/۲٪، NP-40, ۲٪، 2-Mercaptoethanol) مخلوط گردید به مخلوط حاصل پس از ۲ ساعت نگهداری در یخچال به مقدار ۲ میلی‌لیتر استن سرد حاوی ده درصد TCA[3] اضافه گردید و پس از ۲ ساعت نگهداری در فریزر، به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید و از پودر نسبتاً سفید آن جهت الکتروفورز استفاده گردید (Xi *et al.*, 2006).

الکتروفورز پروتئین برگ استخراجی

در این پژوهش برای الکتروفورز پروتئین از روش SDS-PAGE (الکتروفورز در ژل پلی اکریل آمید در حضور سدیم دو دسیل سولفات) استفاده شد. SDS-PAGE در ژل جدا کننده ۱۲/۵ درصد و ژل متراکم کننده ۵ درصد به روش لاملی (Mostafaie, 2003) با بعضی تغییرات انجام گرفت. بعد از استخراج پروتئین‌های برگ، مقدار پروتئین به روش *برادفورد* (Bradford, 1976) اندازه‌گیری شد. الکتروفورز با ولتاژ ۵۰ ولت در ژل متراکم کننده به‌مدت نیم ساعت و با ولتاژ ۱۵۰ولت در ژل جدا کننده به‌مدت ۱/۵ ساعت انجام شد. پس از آماده سازی نمونه‌ها در بافر الکتروفورز، مقدار ۱۵ میکرولیتر از هر نمونه با غلظت یکسان روی ژل بار گذاری گردید. از پروتئین‌های اوترانسفرین (۷۸ کیلو دالتون)، آلبومین گاوی (۶۶ کیلو دالتون)، اوآلبومین (۴۵ کیلو دالتون)، اکتینیدین (۲۹ کیلو دالتون)، بتا- لاکتوگلوبولین (۱۸ کیلو دالتون) و لیزوزیم (۱۴ کیلو دالتون) به‌عنوان نشانگر در ژل استفاده گردید.

رنگ آمیزی ژل پلی اکریل آمید

بعد از الکتروفورز، رنگ آمیزی ژل با کوماسی بریلیانت بلو R-250 صورت گرفت. در این روش مراحل ثبوت و رنگ آمیزی پروتئین‌ها به‌طور هم زمان صورت گرفت. پس از ۱ ساعت قرار گرفتن ژل در محلول رنگ، رنگ‌بری آن توسط محلول رنگ بر (متانول، اسیداستیک گلاسیال و آب مقطر) تا روشن شدن زمینه ژل ادامه یافت و سپس ژل اسکن گردید.

رتبه‌بندی و تجزیه آماری داده‌ها

باندها بر اساس حضور و عدم حضور در هر نمونه امتیاز دهی شدند. برای تعیین فاصله ژنتیکی ماتریس دو طرفه ارقام و متغیرها بر اساس صفر و یک تشکیل شده و سپس آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم افزار NTsys pc Version 2.02e انجام گرفت. تجزیه کلاستر بر اساس ضریب تشابه جاکارد صورت گرفت و در نهایت دندروگرام بر اساس روش UPGMA ترسیم شد.

نتایج و بحث

شکل یک تفکیک پروتئین‌های محلول برگی ژنوتیپ-های کلزا با استفاده از SDS-PAGE در مرحله گل‌دهی کامل در شرایط بدون تنش و شکل دو نیز تفکیک پروتئین‌های

1. Ethylenediaminetetraacetic acid
2. Phenylmethyl-sulphonyl flouride
3. Trichloroacetic acid

محلول برگی ژنوتیپ‌های کلزا با استفاده از SDS-PAGE در مرحله گل‌دهی کامل در شرایط تنش خشکی را نشان می‌دهد. با توجه به نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای الگوی باندی پروتئین برگ ژنوتیپ‌های مورد مطالعه کلزا در شرایط کنترل (بدون تنش) ژنوتیپ‌ها در سه گروه قرار گرفتند (شکل‌های ۳ و ۴) که ۱۳ ژنوتیپ در گروه اول، ۱ ژنوتیپ در گروه دوم و تعداد ۲ ژنوتیپ در گروه سوم قرار گرفتند. در شرایط تنش خشکی ۱۲ ژنوتیپ در گروه اول، ۲ ژنوتیپ در گروه دوم و ۲ ژنوتیپ نیز در گروه سوم قرار گرفتند، با توجه به نتایج ذکر شده نه تنها در دو شرایط محیطی تنوع بین الگوهای باندی وجود دارد که ژنوتیپ‌ها را در این دو شرایط به گروه‌های مجزایی منصوب کرده است، بلکه بین ژنوتیپ‌ها در یک محیط هم تنوع قابل ملاحظه‌ای دیده می‌شود، که استفاده از الگوی باندی پروتئینی بذر و تطبیق نتایج با مطالعه حاضر می‌تواند در بررسی تنوع مفید باشد. هدف عمده استفاده از روش تجزیه خوشه‌ای در به‌نژادی گیاهان زراعی، دسته‌بندی ژنوتیپ‌ها و نمونه‌هایی است که با هم بیشترین فاصله را دارند تا با کمک آن‌ها در برنامه‌های به‌نژادی قادر به تولید تنوع ژنتیکی بالا باشیم (Dini Torkamani & Karapetion 2007; Spangnoletti & Qualset 1987). *رحمان* و *هیراتا* (Rahman & Hirata 2004) در مطالعه الگوی باندی برگ و بذر گونه های متفاوت کلزا (۸۵ رقم) از نظر الگوی باندی پروتئینی در برگ تنوعی را مشاهده نکردند در حالی‌که بذرها دارای ۱۰ پلی‌مورفیسم بودند. همان‌طور که اشاره گردید هر مقدار که والدین از هم دورتر و فاصله بیشتری داشته باشند در برنامه‌های تلاقی و به‌نژادی مورد استفاده و بهره‌برداری بیشتر توسط اصلاح گران نبات جهت انتخاب والدین قرار می‌گیرند.

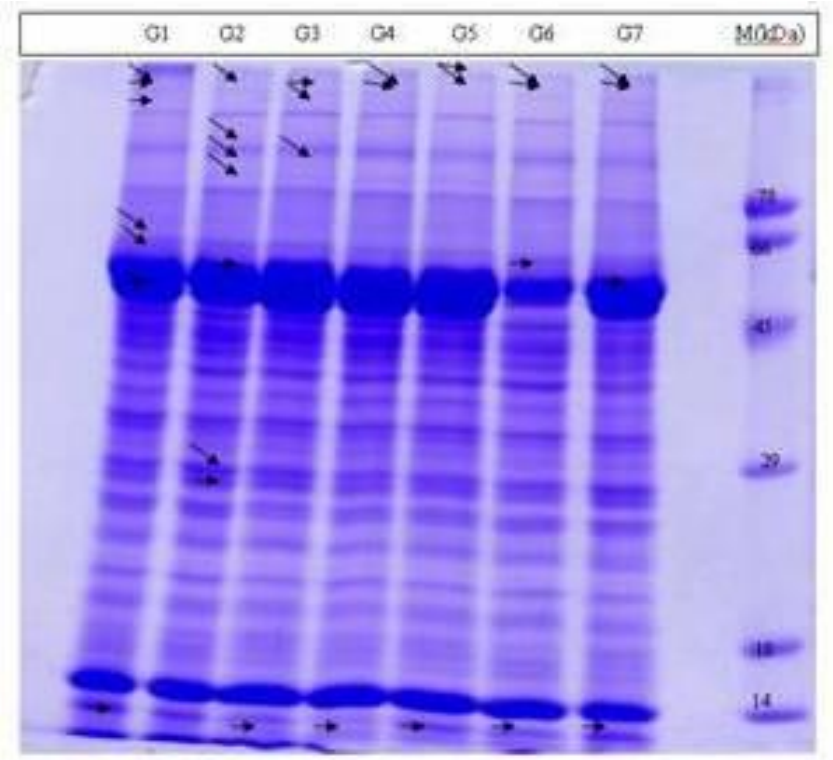
نصر و همکاران (Nasr *et al*., 2006) در بررسی الگوی باندی پروتئین‌های بذر کلزا از تجزیه خوشه‌ای استفاده نموده و ژنوتیپ‌ها را در ۵ کلاس گروه‌بندی کردند.

همان‌طوری که از شکل‌های ژل‌ها پیداست پیکان‌ها حدوداً تفاوت در الگوی باندی (تفاوت از نظر حذف یا اضافه شدن باند پروتئینی و یا تفاوت به لحاظ کمیت و مقدار پروتئین) ژنوتیپ‌های متناظر را در دو شرایط نشان می‌دهد.

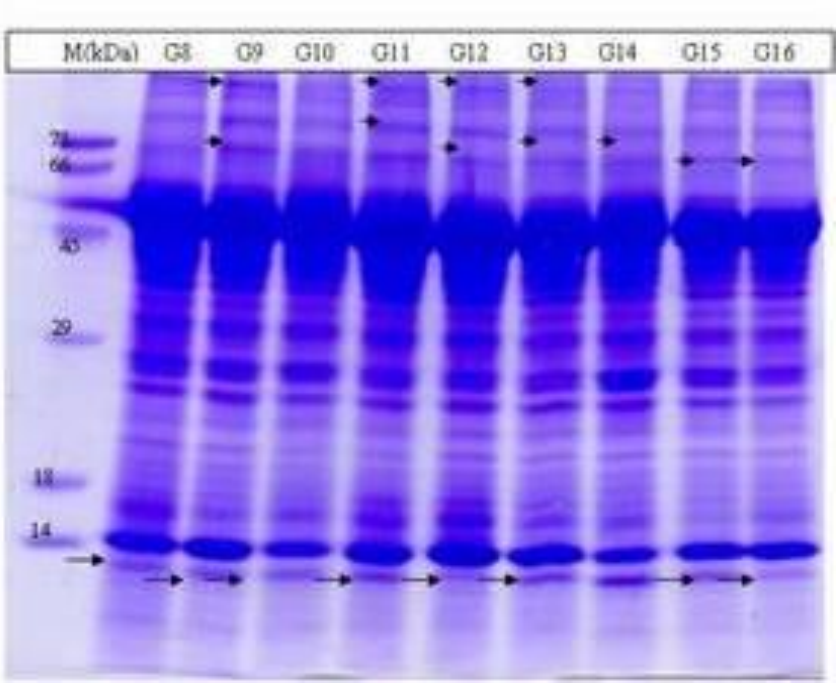
جدول دو و سه به‌ترتیب ضریب تشابه جاکارد مربوط به الگوی باندی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بر مبنای بررسی پروتئین‌های برگ در شرایط بدون تنش خشکی و شرایط خشک را نشان می‌دهد. در شرایط بدون تنش خشکی تشابه ژنتیکی ژنوتیپ‌ها با استفاده از نشانگر پروتئینی و بر اساس ضریب تشابه جاکارد از ۰/۳۶۸ تا ۱ متغیر بود، بیشترین شباهت بین ژنوتیپ‌های (۱ با ۸، ۹ ، ۱۱ و ۱۲)، (۲ با ۳ و ۱۳)، (۷ با ۱۲)، (۸ با ۱۱ و ۱۳)، (۹ با ، ۱۳ و ۱۴)، (۱۲ با ۱۴) و (۱۴ با ۱۵) بود. در شرایط خشک هم‌چنین تشابه ژنتیکی ژنوتیپ‌ها با استفاده از نشانگر پروتئینی و بر اساس ضریب تشابه جاکارد از ۰/۵ تا یک متغیر بود و بیشترین شباهت بین ژنوتیپ‌های (۲ با ۸، ۹، ۱۰ و ۱۶)، (۳ با ۵)، (۶ با ۷)، (۹ با ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۴، ۱۵ و ۱۶)، (۱۰ با ۴، ۱۱، ۱۲، ۱۴، ۱۵ و ۱۶)، (۱۱ با ۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۵ و ۱۶) و (۱۲ با ۱۳) بود. *سادیا* و همکاران (Sadia *et al*., 2009) در مطالعه‌ای با عنوان خصوصیات الکتروفورتیک و ارتباط بین برخی گونه‌های جنس براسیکا گزارش کردند که بر اساس الگوی باند پروتئین‌های ذخیره بذر ۳۱ واریته از جنس مذکور را در سه گروه دسته‌بندی نمودند. *عباس* و همکاران (Abbas *et al*., 2008)، نیز برآورد میانگین فاصله ژنتیکی در کلزا بر اساس مارکر ملکولی DNA را مطالعه کردند و میانگین فاصله ژنتیکی از صفر تا ۱۰۰ درصد متغیر بود.

بر اساس یافته‌های این پژوهش مشخص شد که الگوی باندی و به تبع آن گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها در دو شرایط محیطی متفاوت است. علت عمده این امر را می‌توان به تغییر در بیان ژن‌ها و در نتیجه بروز آن در الگوی پروتئین‌ها تحت دو شرایط مختلف رشدی دانست، چرا که تنش خشکی به‌نحوی می‌تواند در کاهش یا افزایش بیان پروتئین‌ها موثر باشد.

هم‌چنین بر اساس مطالعات شاخص‌های مقاومت به خشکی و عملکرد در دو شرایط تنش خشکی و نرمال در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در این پژوهش (بخش دیگری از مطالعه ژنوتیپ‌های مذکور) ژنوتیپ‌های Dante، SLM-046 و Sahara دارای عملکرد بیشتری در هر دو محیط بودند، بر اساس دندروگرام حاصل از تجزیه کلاستر بر اساس شاخص‌های YI، HAM، STI، GMP و MP به روش UPGMA ژنوتیپ‌های Dante، SLM-046 و Sahara در یک گروه قرار گرفتند (Kakaei *et ah*, 2010). که در نمودار دندانه‌ای ژنوتیپ‌های مورد مطالعه (شکل‌های ۳ و ۴) بر مبنای پروتئین‌های برگ در شرایط کنترل هم این ژنوتیپ‌ها در یک گروه و کنار یکدیگر قرار گرفته‌اند و چنان‌که از نمودار دندانه‌ای ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بر مبنای بررسی پروتئین های برگ در شرایط تنش خشکی مشخص است ژنوتیپ‌های Dante و SLM-046 در یک گروه قرار دارند.



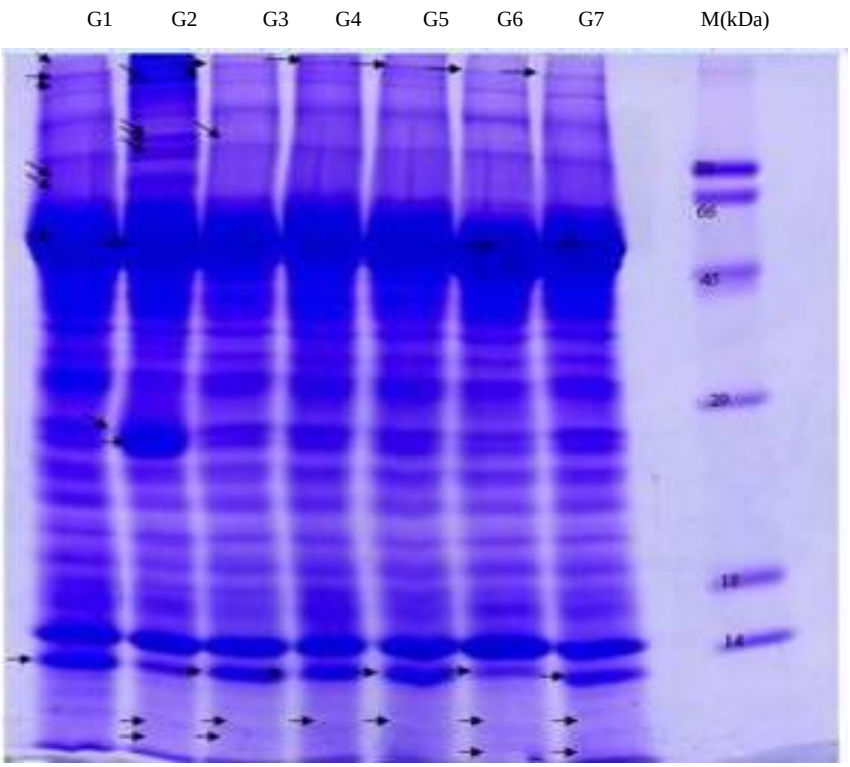
الف (A)



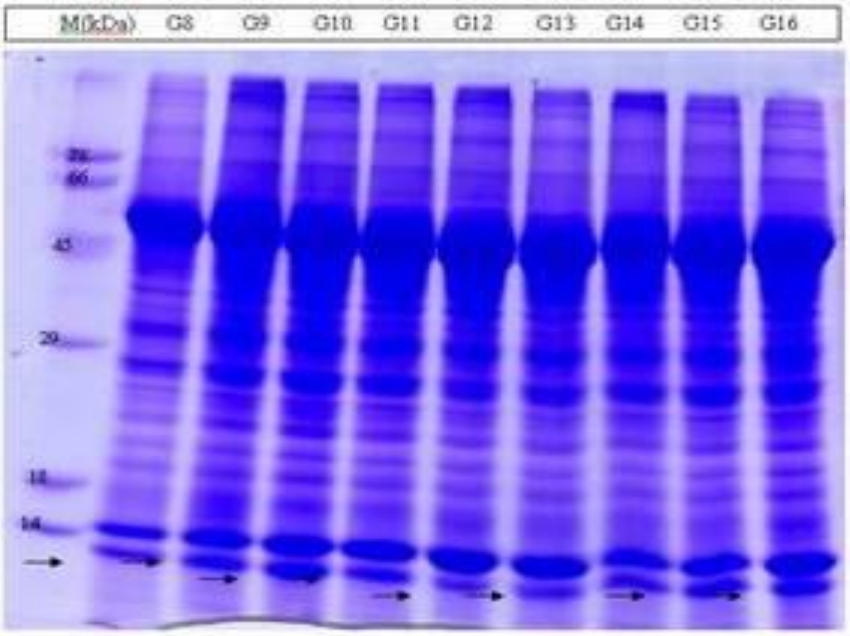
ب (B)

شکل ۱: الف و ب تفکیک پروتئین‌های محلول برگی ژنوتیپ‌های کلزا با استفاده SDS-PAGE در مرحله گلدهی کامل در شرایط بدون تنش

Figure 1: A&B separation of soluble leaf proteins of rapeseed genotypes using SDS-PAGE in the complete flowering stage in stress condition



الف (A)



ب (B)

شکل ۲: الف و ب تفکیک پروتئین‌های محلول برگی ژنوتیپ‌های کلزا با استفاده SDS-PAGE در مرحله گلدهی کامل در شرایط تنش

Figure 2: A&B separation of soluble leaf proteins of rapeseed genotypes using SDS-PAGE in the complete flowering stage in stress condition

جدول ۲: ضریب تشابه جاکارد مربوط به الگوی باندی ژنوتیپ های مورد مطالعه بر مبنای بررسی پروتئین های برگ در شرایط نرمال (بدون تنش خشکی)

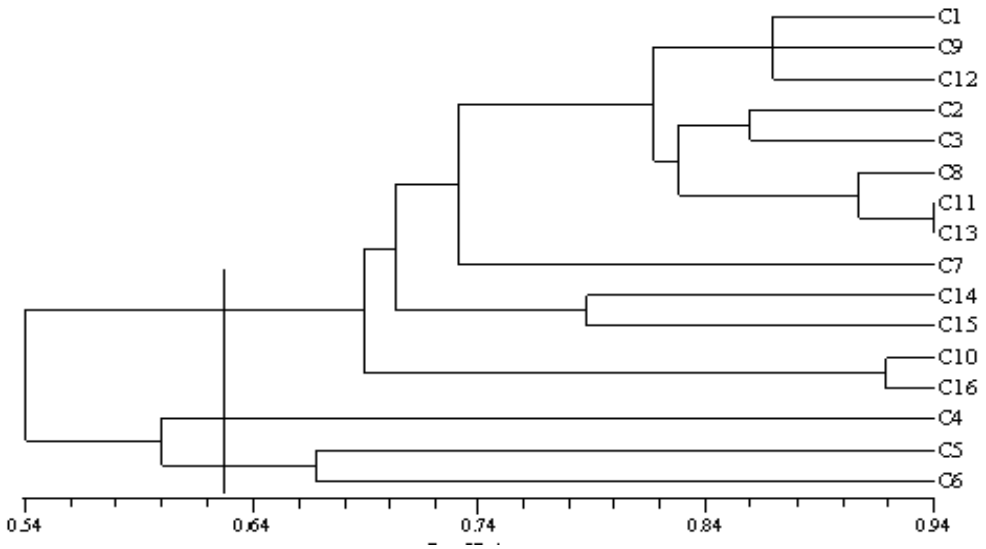
Table 2: Jaccard's similarity coefficient based on protein pattern related genotypes the study of leaf proteins in no drought conditions

ژنوتیپ Genotypes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
2	0.833	1														
3	0.833	0.822	1													
4	0.633	0.812	0.812	1												
5	0.722	0.764	0.666	0.637	1											
6	0.526	0.647	0.555	0.666	0.733	1										
7	0.777	0.722	0.823	0.647	0.526	0.421	1									
8	0.888	0.833	0.833	0.666	0.823	0.611	0.684	1								
9	0.888	0.833	0.833	0.666	0.631	0.526	0.777	0.789	1							
10	0.823	0.666	0.666	0.5	0.555	0.368	0.611	0.722	0.823	1						
11	0.894	0.842	0.842	0.684	0.736	0.631	0.789	0.894	0.894	0.736	1					
12	0.888	0.833	0.833	0.666	0.631	0.526	0.882	0.789	0.888	0.722	0.894	1				
13	0.842	0.888	0.888	0.722	0.777	0.666	0.736	0.944	0.842	0.684	0.947	0.842	1			
14	0.789	0.736	0.736	0.578	0.631	0.526	0.777	0.789	0.789	0.722	0.894	0.888	0.842	1		
15	0.684	0.722	0.722	0.555	0.611	0.5	0.666	0.777	0.777	0.705	0.789	0.777	0.833	0.882	1	
16	0.823	0.666	0.666	0.5	0.555	0.368	0.611	0.722	0.823	0.866	0.736	0.722	0.684	0.722	0.705	1

جدول ۳: ضریب تشابه جاکارد مربوط به الگوی باندی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بر مبنای بررسی پروتئین‌های برگ در شرایط تنش خشکی

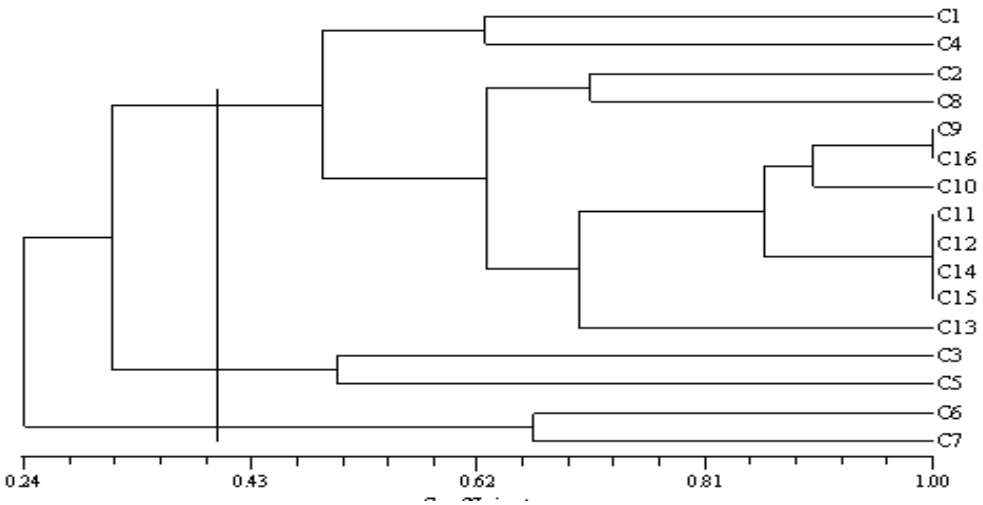
Table 3: Jaccard's similarity coefficient band based on protein pattern related genotypes the study of leaf proteins in drought conditions

ژنوتیپ Genotypes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
2	0.631	1														
3	0.8	0.75	1													
4	0.823	0.777	0.75	1												
5	0.8	0.647	0.846	0.75	1											
6	0.733	0.588	0.769	0.687	0.769	1										
7	0.687	0.647	0.714	0.75	0.714	0.916	1									
8	0.611	0.875	0.733	0.666	0.733	0.666	0.625	1								
9	0.736	0.888	0.666	0.789	0.578	0.611	0.666	0.777	1							
10	0.789	0.842	0.631	0.842	0.631	0.578	0.631	0.736	0.947	1						
11	0.777	0.833	0.705	0.736	0.611	0.647	0.611	0.823	0.944	0.894	1					
12	0.777	0.833	0.705	0.736	0.611	0.647	0.611	0.823	0.944	0.894	1	1				
13	0.666	0.722	0.588	0.631	0.588	0.625	0.588	0.812	0.833	0.789	0.882	0.5	1			
14	0.777	0.833	0.705	0.736	0.611	0.647	0.611	0.823	0.944	0.894	1	1	0.882	1		
15	0.777	0.833	0.705	0.736	0.611	0.647	0.611	0.823	0.944	0.894	1	1	0.882	1	1	
16	0.736	0.888	0.666	0.789	0.578	0.611	0.666	0.777	1	0.947	0.944	0.944	0.833	0.944	0.944	1



شکل ۳: دندروگرام ژنوتیپ‌های کلزای مورد مطالعه بر مبنای بررسی پروتئین‌های برگ در شرایط کنترل (نرمال)

Figure 3: Dendrogram of a genotype based study of leaf proteins in control conditions (normal)



شکل ۴: دندروگرام ژنوتیپ‌های کلزای مورد مطالعه بر مبنای بررسی پروتئین‌های برگ در شرایط تنش خشکی

Figure 4: Dendrogram genotypes studied on the basis of leaf proteins in drought conditions

منابع:

جهت ملاحظه منابع به صفحه‌های ۱۱-۱۲ متن انگلیسی مراجعه شود.

Study of Protein Pattern in *Brassica napus* Genotypes under non-stress and Drought Stress Conditions

Kakaei[1]*, M., Zebarjadi[2], A. and Mostafaie[3], A.

Abstract

Protein electriphoresis is one of the method for determinat genetic diversity in plants. In order to investigate protein pattern in rapeseed, sixteen genotypes of *Brassica napus* were studied in a randomized complete blocks design (RCBD) with three replications under drought and non_drought stress conditions. In complete flowering stage, leaves total protein of leaves was extracted in both conditions. The extracted proteins were seprated based on Laemmli method using SDS-PAGE in a 12.5% and 5% resolving and stacking gels, respectively. Mean genetic distance was estimated in normal and drought stress condition ranged from 0.056 - 0.632 and 0.0 to 0.5, respectively. Results of cluster analysis showed that the genotypes, according to protein pattern and based on Jaccard's similarity coefficient were placed in three groups in both conditions. Groups were different in drought and non_drought sites. Results of SDS-PAGE showed that protein pattern bands were almost different among of the genotypes. According to this reasearch results, Banding pattern and grouping genotypes in both normal and drought conditions were different.

Keyword: Canola, Genetic Diversity, Discontinuous Electrophoresis, Cluster Analysis

References

Ahmadi mosavi, A. A., and Manochehri kalantari, KH. 2006. The effect of 24-Epibrassinolid on seed germination, plant growth and biochemical parameters *Brassica napus* L. under drought strss. Journal of Basic Sciences, Isfahan University. 24(2): 1-16.

Abbas, S. J., Farhatullah., Khan, I. A., Marwat, K. B. and Munir, I. 2008. Molecular and Biochemical Assessment of *Brassica napus* and Indigenous Campestris Species. *Pakistan Journal of Botany*., 40(6): 2461-2469

Bradford, M. 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.

Dini Torkamani, M. R. and Karapetion, J. 2007. An Investigation of Seed Protein Content and Variation in Ten Sesame Varieties (*Sesamum indicum* L.). Science and Technology Agriculture and Natural. 11(40): 225-230.

Fareghi, S. H. Farshadfar, M. and Farshadfar, E. 2007. Study of chemical composition and nutrition value of perennial Lucerne (*Medicago sativa* L.) and genetic diversity based on SDS-PAGE markers. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research,15(3): 196-210.

Ferozi, B., Sofalian, O. and Said Masumi, S. E. 2010. Evaluation Of Genetic Diversity In Cotton Cultivars Using Seed Protein Markers. The proceeding of 11th Iranian Crop Science Congress.

Javaid, A., Ghafoor, A. and Anwar, R. 2004. Seed Storage Protein Electrophoresis In Groundnut For Evaluating Genetic Diversity. Pakistan Journal of Botany. 36(1): 25-29.

Hasan, M., Seyis, F., Badani, A. G., Pons-kuhnemann, J., Friedt, W., Luhs, W. and Snowdon, R. J. 2006. Analysis of genetic diversity in the *Brassica napus* L. gene pool using SSR markers. Genetic. Resources. Crop. Evolution. 53(4): 793-802. Hristov N (1999).

Kakaei, M. and Mostafaie, A. 2010. Study of Seed Proteins Pattern of *Cicer arientinum* by Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamid Gel Electrophoresis. The 3rd Iranian Pulse Crops Symposium, 19-20 may 2010.

Kakaei, M., Zebarjadi, A., Mostafaie, A. and Rezaei zad, A. 2011. Determination of drought tolerant genotypes in *Brassica napus* L. based on drought tolerance indices. Electronic Journal of Crop Production, (In press).

Khayami, M., Hedari, R. and Vargazadeh, T. 2005. Classify some canola cultivars based on total protein and fatty acids and seed storage. Iranian Journal of Agricultural Sciences. 36(5): 1207-1214.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685.

Mostafaie, A. 2003. Theoretical and practical guide Protein Electrophoresis in Gel. Press yadavaran.

Nasr, N., Khayami, M., Heidari, R. and Jamei, R. 2006. Genetic Diversity among Selected Varieties of *Brassica napus* (Cruciferae) Based on the Biochemical Composition of Seeds. JUST 32(1), P 37-40.

1. Agriculture (Plant Breeding and Genetic) Department, Payame Noor University, Tehran.

2. Department Of Plant Breeding and Biotecnology for Environmental Stress, Faculty of Agriculture, Razi University, Kermanshah.

3. Medical Biology Rsearch Center, Kermanshah University of Medical Sciences.

*: Corresponding author

Siddiqui, Z.SH., Khan, M. A., Kim, B., Huang, J. and Kwon, T. 2008. Physiological Responses of *Brassica napus* Genotypes to Combined Drought and Salt Stress. Journal of Plant Stress. 2(1), 78-83.

Rahman, M. M. and Hirata, Y. 2004. Genetic Diversity in *Brassica* Species Using SDS-PAGE Analysis. Journal of Biological Sciences 4(2): 234-238.

Sadia, M., Malik, S. A., Rabbani, M. A. and Pearce, S. R. 2009. Electrophoretic Characterization and the Relationship between Some Brassica Species. Electronic Journal of Biology, Vol. 5(1): 1-4

Spangnoletti Zeuli, P. L., and Qualset, C. O. 1987. Geographical diversity for quantitative spike characters in a world collection of durum wheat. Crop Science. 27: 235-241.

Xi, J., Wang, X., Li, S., Zhou, X., Yue, L., Fan, J. and Hao, D. 2006. Polyethylene glycol fractionation improved detection of low abundant proteins by two-dimensional electrophoresis analysis of plant proteome. Phytochem. 67: 2341-2348.

To look at the figures and tables, please refer to the Persian text (pages: 49-57= ۴۹-۵۷).